

Université de Montréal

**STATUT DES TRANSPORTEURS DU CHOLESTÉROL AU NIVEAU DE
L'INTESTIN ET DU FOIE DANS LE DIABÈTE DE TYPE 2**

par

Geneviève Lalonde

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

Avec mémoire

Août 2008

© Geneviève Lalonde, 2008

Université de Montréal
Faculté des Études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Statut des transporteurs du cholestérol au niveau de l'intestin et
du foie dans le diabète de type 2**

Présenté par :
Geneviève Lalonde

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Olivier Receveur, président-rapporteur
Dr Emile Levy, directeur de recherche
Dr Dominique Garrel, membre du jury

RÉSUMÉ

La résistance à l'insuline et le diabète de type 2 (DT2) sont caractérisés par une hyperlipidémie. Le but de cette étude est de déterminer si le DT2 contribue au dérèglement du métabolisme du cholestérol au niveau du petit intestin et du foie du *Psammomys obesus*, un modèle animal nutritionnel d'induction de la résistance à l'insuline et du DT2. L'absorption intestinale du cholestérol est diminuée chez les animaux diabétiques. Cette diminution est associée à une baisse (i) de l'expression génique et protéique de NPC1-L1 qui joue un rôle primordial dans l'absorption du cholestérol au niveau des entérocytes; et (ii) de l'ARNm de l'ABCA1 responsable de l'efflux de cholestérol des cellules intestinales à l'apolipoprotéine A-I et aux HDLs. En ce qui a trait aux transporteurs SR-B1 et Annexin II, aucune différence n'a été observée au niveau intestinal. Toutefois, une diminution significative de l'expression génique de l'ABCG5, un intervenant majeur dans la sécrétion du cholestérol des entérocytes vers la lumière intestinale, est mesurée chez les animaux diabétiques. De plus, l'expression protéique est diminuée pour le PCSK9 et augmentée pour le LDLr au niveau du jéjunum, tandis que la quantité de protéine de l'enzyme HMG-CoA réductase est régulée à la baisse chez les *Psammomys obesus* diabétiques. Finalement, de tous les facteurs de transcription testés seule une augmentation de LXR α et une diminution de PPAR β/δ sont détectées au niveau de l'intestin. Au niveau hépatique, il y a (i) une augmentation de la masse protéique de NPC1-L1, SR-BI et Annexin II; (ii) une élévation l'ARNm de SR-BI; (iii) une diminution du contenu protéique de ABCG8 et de l'expression génique de l'ABCG5 et de l'ABCA1; et (iv) une élévation de l'ARNm de LXR α et de PPAR β/δ , tout comme une baisse de l'expression protéique de SREBP-2. Somme toute, nos résultats montrent que le développement du diabète de type 2 chez le *Psammomys obesus* entraîne un changement dans la machinerie intra-entérocytaire et hépatocytaire, qui mène à un dérèglement de l'homéostasie du cholestérol.

Mots clés : Entérocyte, Foie, Transport du cholestérol, HMG-CoA reductase, transcriptor factors, *Psammomys obesus*

ABSTRACT

Insulin resistance and type 2 diabetes (T2D) are characterized by hyperlipidemia. The aim of the present study was to elucidate whether T2D contributes to abnormal cholesterol homeostasis in the small intestine and liver of *Psammomys obesus*, a model of nutritionally induced insulin resistance and type 2 diabetes. Diabetic animals exhibited a lower intestinal cholesterol uptake, which was associated with a decrease in (i) the gene and protein expression of NPC1L1, which plays a pivotal role in cholesterol incorporation in the enterocytes; and (ii) mRNA of ABCA1 that mediates cholesterol efflux from intestinal cells to apolipoprotein A-I and HDL. No changes were observed in the other intestinal transporters SR-BI and Annexin II. On the other hand, in diabetic animals, a significant mRNA decrease was noticed in ABCG5 responsible for the secretion of absorbed cholesterol back into the lumen. Furthermore, jejunal PCSk9 protein was diminished and LDLr was raised, along with a significant downregulation in jejunal HMG-CoA reductase in diabetic *Psammomys obesus*. Finally, among the transcription factors tested, only an increase in LXR α and a decrease in PPAR β/δ were detected in the intestine. In the liver, there was (i) an augmentation in the protein mass of NPC1L1, SR-BI and Annexin II; (ii) an upregulation of SR-BI mRNA; (iii) a fall in ABCG8 protein content, ABCG5 mRNA and ABCA1 mRNA; and (iv) an augmentation in LXR α and PPAR β/δ mRNA, as well as a drop in SREBP-2 protein. Overall, our findings show that the development of type 2 diabetes in *Psammomys obesus* modifies the whole intra-enterocyte and hepatocyte machinery, causing alterations in cholesterol homeostasis.

Key words: Enterocyte, liver, cholesterol transport, HMG-CoA reductase, transcription factors, *Psammomys obesus*

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE.....	i
PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS.....	xiii
 1. INTRODUCTION.....	 1
 1.1 LE CHOLESTÉROL.....	 3
 1.2 TRANSPORT DU CHOLESTÉROL EN SITUATION PHYSIOLOGIQUE NORMALE.....	 4
1.2.1 Transporteurs du cholestérol impliqués dans l'absorption intestinale et la capture hépatique du cholestérol.	8
1.2.1.1. Les «Scavenger Receptors» SRs.....	9
1.2.1.1.1 Le «Scavenger Receptors class B type 1» SR-B1	9
1.2.1.1.2 «Fatty acid translocase/cluster of differentiation 36» FAT/CD36...11	
1.2.1.2 «Niemann Pick C1-Like1» NPC1-L1	13
1.2.1.3 Annexine II/Caveoline-1 (ANAX2/CAV-1)	16
1.2.1.4 «Low-density-lipoprotein receptor» LDLr et la « proprotein convertase subtilisin/kexin 9 » PCSK9	17
1.2.1.5 «ATP-binding cassette protein» (ABC).....	19
1.2.1.5.1 «ATP-binding cassette transporter A1» ABCA1	20
1.2.1.5.2 «ATP-binding cassette transporter G5/G8» ABCG5 et ABCG8 ...	22

1.2.2 Enzymes impliquées dans le transport du cholestérol	24
1.2.2.1 «3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase» HMG-CoA reductase ...	24
1.2.2.2 «Acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransférase» ACAT	26
1.2.2.2.1 ACAT-2	27
1.2.3 Les facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation du transport du cholestérol	28
1.2.3.1 « Sterols-Regulatory-Element-Binding-Protein » SREBPs	28
1.2.3.1.1 SREBP-2	30
1.2.3.2 «Liver X Receptor» LXRs	31
1.2.3.3 Les «Peroxisome Proliferator-activated Receptor» PPARs	34
1.2.3.3.1 PPAR α	35
1.2.3.3.2 PPAR β/δ	36
1.2.3.3.3 PPAR γ	37
 1.3 RÉSISTANCE À L'INSULINE ET DIABÈTE DE TYPE 2 ASSOCIÉS À L'OBÉSITÉ	40
1.3.1 La résistance à l'insuline	40
1.3.2 Le diabète de type 2	41
 1.4 TRANSPORT DU CHOLESTÉROL DANS LA RÉSISTANCE À L'INSULINE ET LE DIABÈTE DE TYPE 2	42
1.4.1 Les transporteurs intestinaux et hépatiques du cholestérol dans la résistance à l'insuline et le DT2	43
1.4.1.1 SR-B1	43
1.4.1.2 FAT/CD36	44
1.4.1.3 NPC1-L1	45
1.4.1.4 ANAX2/CAV-1	45
1.4.1.5 LDLr et PCSK9	46
1.4.1.6 ABCA1	47
1.4.1.7 ABCG5 et ABCG8	48
1.4.2 Enzymes impliquées dans le transport du cholestérol dans la résistance à l'insuline et le diabète de type 2	49

1.4.2.1 HMG-CoA réductase	49
1.4.2.2 ACAT-2	50
1.4.3 Facteurs de transcription impliqués dans la régulation du transport du cholestérol dans la résistance à l'insuline et le diabète de type 2	51
1.4.3.1 SREBPs	52
1.4.3.1.1 SREBP-2	52
1.4.3.2 LXRs	53
1.4.3.3 PPARs	53
1.4.3.3.1 <i>PPARα</i>	54
1.4.3.3.2 <i>PPARδ</i>	54
1.4.3.3.3 <i>PPARγ</i>	55
2. OBJECTIFS	56
3. ARTICLE	58
4. DISCUSSION	96
5. BIBLIOGRAPHIE	103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Distribution et fonctions des facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme du cholestérol.....	p.39
-------------------	--	------

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Structure du cholestérol.....	p.3
Figure 2.	Structure des lipoprotéines.....	p.4
Figure 3.	Homéostasie du cholestérol dans la cellule intestinale.....	p.6
Figure 4.	Transport entéro-hépatique du cholestérol.....	p.8
Figure 5.	Capture hépatique des lipoprotéines contenant l'apoB et l'apoE par le récepteur deLDLs.....	p.18
Figure 6.	Structure de l'ABCA1 et de l'ABCG5/8.....	p.20
Figure 7.	Synthèse du cholestérol par la voie de l'HMG-CoA réductase.....	p.25
Figure 8.	Ubiquitination de la HMG-CoA réductase associée à la liaison de la protéine Insig-1.....	p.26
Figure 9.	Clivage protéolytique de SREBP-2 par SCAP lors d'une déplétion de cholestérol cellulaire.....	p.29
Figure 10.	Interaction entre SREBP et LXR dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol.....	p.33
Figure 11.	Liaison du complexe PPAR/RXR sur la séquence d'ADN spécifique PPRE.....	p.35
Figure 12.	Le <i>Psammomys obesus</i>	p.57
Figure 13 :	Représentation schématique des résultats obtenus au niveau intestinal des <i>Psammomys obesus</i> diabétiques.....	p.97
Figure 14 :	Représentation schématique des résultats obtenus au niveau hépatique des <i>Psammomys obesus</i> diabétiques.....	p.98

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABCA 1	ATP binding cassette A1
ACAT	Acyl-CoA : cholesterol O-acyltransferase
ANAX2	Annexin-2
Apo	Apolipoprotéine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CAV1	Caveolin-1
CM	Chylomicrons
DT2	Diabète de type 2
EC	Esters de cholestérol
FAT/CD36	Fatty acid translocase/Cluster determinant 36
HDL	High density Lipoprotein
HMG-CoA reductase	3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase
Insig-1	Insulin-induced gene 1
LDL	Low density Lipoprotein
LDLr	Récepteur des LDLs
LPL	Lipoprotéine Lipase
LXR	Liver X Receptor
LXRE	LXR response element
NPC1-L1	Niemann Pick C1-Like1
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	Peroxisome proliferator response element

RXR	Retinoic X Receptor
S1P	Site-1 protéase
S2P	Site-2 protéase
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SR	Scavenger receptor
SR-B1	Scavenger receptor class B type 1
SRE	SREBP response element
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
VLDL	Very Low density Lipoprotein

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Emile Levy, pour son dévouement, sa générosité et sa disponibilité. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir fait confiance et permis de me joindre à son équipe.

Un grand merci également à tous ceux qui ont su rendre mon passage au laboratoire des plus agréables. Je remercie particulièrement Carole pour ses innombrables qualités qui en font une femme si exceptionnelle, et Zola pour le dévouement dont elle fait preuve dans son travail. Je voudrais aussi remercier les docteurs Alain, Michel et Mounib, pour leur disponibilité, leur gentillesse et leurs judicieux conseils. Évidemment, je tiens à remercier Louis-Philippe et François, d'avoir illuminé mes journées de leur bonne humeur quotidienne, mais surtout pour leur amitié qui m'est très précieuse.

Un immense merci à mes parents et à ma sœur Patricia pour m'avoir soutenue pendant ces nombreuses années. Jamais je ne pourrai vous exprimer toute ma reconnaissance pour votre générosité et l'amour que vous m'apportez. Merci à Yasmina et Anick, deux amies très chères, pour leur aide et leurs encouragements. Finalement, je ne remercierai jamais assez mon amoureux, Guillaume, pour son support, sa patience, sa compréhension et pour faire partie de ma vie. Merci !

1. INTRODUCTION

L'obésité est une maladie chronique caractérisée par un excès pondéral dû à une augmentation du tissu adipeux. Elle résulte de l'interaction complexe entre facteurs génétiques, environnementaux (sociaux et culturels), psychologiques et comportementaux.¹ Actuellement, l'obésité a atteint des proportions épidémiques à l'échelle mondiale et a des conséquences majeures sur la santé humaine, puisqu'elle a la capacité d'engendrer la résistance à l'insuline qui constitue une composante majeure de l'étiologie du diabète de type 2 (DT2).¹ Les prédictions laissent croire qu'en 2025, environ 300 millions de personnes souffriront de ce type de diabète à travers le monde.² Il est donc primordial d'améliorer la compréhension de ces physiopathologies puisqu'elles sont associées aux dyslipidémies, et par le fait même, aux maladies cardiovasculaires, qui représentent la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients souffrant de DT2.²

L'association entre l'obésité, la résistance à l'insuline et le DT2 est bien établie. Par contre, les mécanismes reliant ces désordres sont plutôt complexes et plusieurs aspects restent incompris. On sait, cependant, que le DT2 est associé, entre autres, à un dérèglement du métabolisme des lipides. Il est donc d'une importance capitale d'étudier les causes des dyslipidémies. Puisque le foie et l'intestin font partie des principaux intervenants dans le métabolisme des lipides, il s'avère essentiel de bien comprendre leur implication dans l'hyperlipidémie, particulièrement l'hypercholestérolémie associée à la résistance à l'insuline et au DT2.

Depuis quelques années, les connaissances quant à la contribution intestinale et hépatique dans les anomalies des acides gras, des triacylgérols et des lipoprotéines s'intensifient. En effet, plusieurs études ont déjà démontré que la dyslipidémie chez les diabétiques de type 2 est caractérisée par une diminution des HDLs circulants et une augmentation des chylomicrons, des

VLDLs plasmatiques et des petits LDLs denses.^{3, 4} Toutefois, peu de travaux se sont penchés sur la régulation du métabolisme, et plus spécifiquement, le transport du cholestérol dans cette pathologie. Le but premier de notre étude sera de déterminer le statut des différentes protéines gouvernant le transport et le métabolisme du cholestérol ainsi que des facteurs de transcription impliqués dans la régulation des transporteurs lors du DT2.

Afin de répondre à cet objectif, les expériences seront menées sur le *Psammomys Obesus*, un modèle animal de résistance à l'insuline et de DT2. Le *Psammomys Obesus*, souvent nommé « Fat sand rat » dans la littérature scientifique, est une gerboise vivant dans les régions désertiques de l'Afrique du Nord et de la Méditerranée. Dans son habitat naturel, il se nourrit exclusivement de plantes dont le contenu énergétique est très faible. Lorsqu'on le met en captivité, exposé à une diète de laboratoire normale, il développe séquentiellement une obésité, une insulino-résistance et un DT2 qui ressemblent en plusieurs points au diabète retrouvé chez l'homme.^{5, 6}

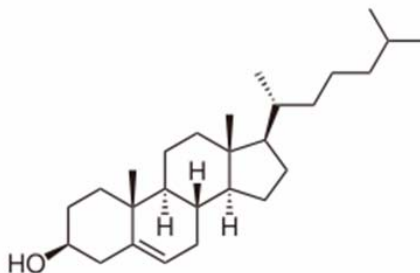
L'introduction de ce mémoire vise, dans un premier temps, à résumer les connaissances sur le métabolisme, principalement le transport du cholestérol, au niveau intestinal et hépatique, dans des conditions physiologiques normales. Par la suite, une brève revue de littérature permettra de décrire les altérations observées dans le métabolisme du cholestérol lorsqu'il y a une résistance à l'insuline et un DT2.

1.1 LE CHOLESTÉROL

Le cholestérol est un lipide retrouvé au niveau des membranes cellulaires des vertébrés. Il joue un rôle central dans plusieurs processus biochimiques tels que la composition et la fluidité de la membrane cellulaire en s'intercalant entre les phospholipides. Il est également le précurseur de différentes molécules, telles que la vitamine D₃, les hormones stéroïdiennes non sexuelles (cortisol, cortisone et l'aldostérone), les hormones stéroïdiennes sexuelles (progestérone, œstrogène, testostérone) et les acides biliaires.⁷ Le cholestérol est donc une molécule essentielle à la vie. Il est, cependant, bien établi que des taux élevés de cholestérol plasmatique représentent un risque important de développer les maladies cardiovasculaires.⁷

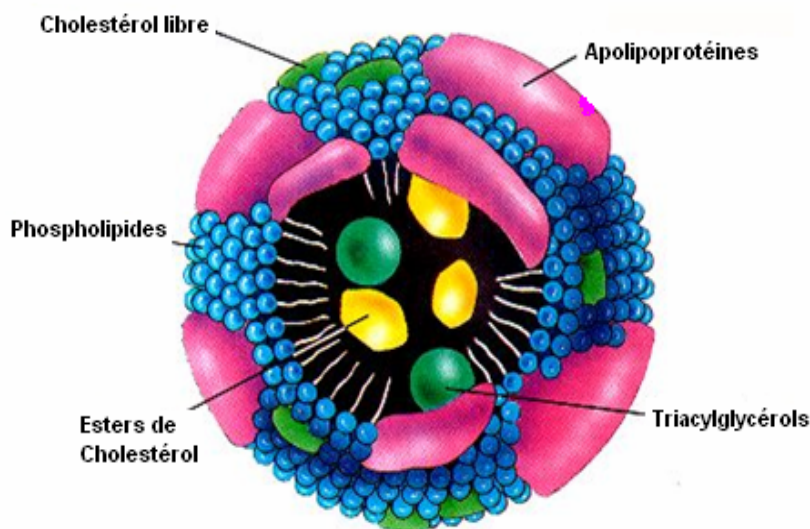
La molécule de cholestérol comprend 4 cycles carbonés notés A, B, C et D, et 8 carbones asymétriques, ce qui en fait un total de 256 stéréoisomères, dont un seul existe : le cholestérol. Ce dernier possède également un groupe hydroxyle-OH très hydrophobe sur le carbone 3 conférant ainsi à la molécule de cholestérol une faible solubilité. Le groupement OH du cholestérol peut être estérifié en incorporant un acide gras, ce qui rend la molécule totalement insoluble dans l'eau.⁷

Figure 1 : Structure du cholestérol



Étant un composé hydrophobe, le cholestérol est insoluble dans le sang. Son transport est donc assuré par différentes lipoprotéines. Ces dernières sont de grands complexes de protéines et de graisses hydrosolubles, qui transportent massivement les lipides dans tout l'organisme. La couche externe est formée de phospholipides et de cholestérol libre en combinaison avec une ou plusieurs molécules protéiques appelées apolipoprotéines (apo), protéines constitutives importantes des lipoprotéines. La partie centrale contient des triacylglycérols, des esters de cholestérol et de petites quantités d'autres substances hydrophobes, comme des vitamines liposolubles ou des médicaments.

Figure 2 : Structure des lipoprotéines

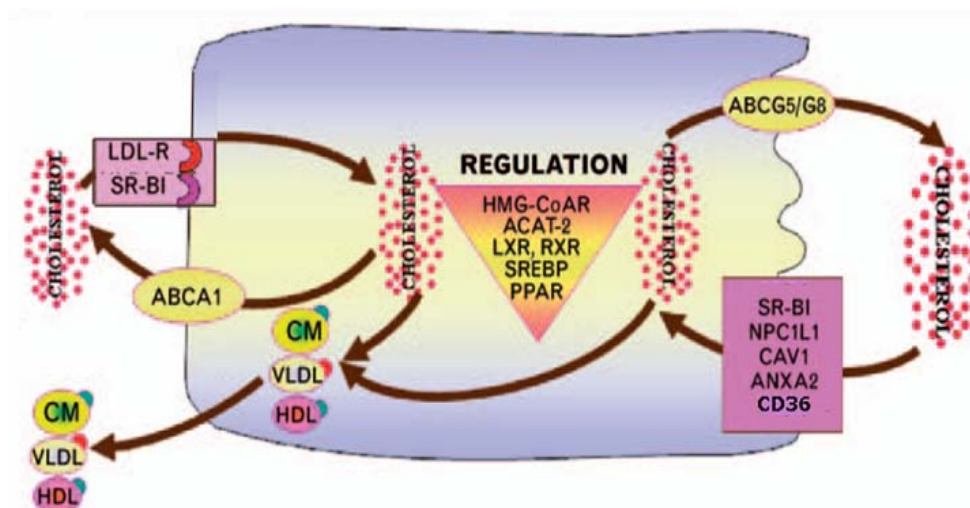


1.2 TRANSPORT DU CHOLESTÉROL EN SITUATION PHYSIOLOGIQUE NORMALE

Bien que le foie ait longtemps été considéré comme étant le centre de contrôle du maintien de l'homéostasie du cholestérol, on reconnaît depuis quelques années le rôle primordial que joue l'intestin dans cet équilibre et dans la régulation du cholestérol plasmatique.⁸ Le cholestérol absorbé au niveau du tractus digestif, c'est-à-dire le cholestérol qui passe de la lumière intestinale au

système lymphatique, provient de sources exogène et endogène. Le cholestérol exogène provient de la diète (300-500 mg), tandis que le cholestérol endogène provient de la bile (800-1200 mg) et des cellules desquamées (300mg).⁹ Lorsque le cholestérol arrive dans la lumière de l'intestin, il est hydrolysé. Ensuite, le cholestérol libre (hydrophobe) est solubilisé sous forme de micelles à l'aide des sels biliaires et du jus pancréatique, puis capté par différents transporteurs récemment découverts situés au niveau de la membrane apicale des entérocytes.¹⁰ Parmi ces transporteurs, on retrouve, entre autres, les « scavenger receptor class B », (SR-B1) et « Fatty acid translocase / cluster determinant » (FAT/CD36), la protéine Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1-L1) et le complexe protéique Annexin II/Caveoline-1 (ANAX2/CAV-1). Une fois dans l'entérocyte, le cholestérol absorbé au niveau de la bordure en brosse ou le cholestérol nouvellement synthétisé par la 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA réductase (HMG-CoA réductase) est estérifié par l'Acyl-coenzyme A : cholestérol acyltransférase (ACAT) au niveau du réticulum endoplasmique, puis incorporé dans les lipoprotéines. La cellule intestinale contribue principalement à la formation des chylomicrons (CM), une lipoprotéine riche en triacylglycérol ainsi qu'à un moindre degré à la formation des « Very-low-density lipoproteins » (VLDLs) et des « High-density lipoproteins » (HDLs). Le cholestérol cellulaire peut également être excrété de l'entérocyte vers la lumière intestinale via d'autres protéines transmembranaires, les « ATP-Binding Cassette » (ABC) ABCG5 et ABCG8 ou être sécrété du côté basolatéral via l'ABCA-1 qui livre le cholestérol à l'apo A-1, la protéine constituante des HDLs. La lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme endothéliale, va par la suite hydrolyser les triacylglycérols des CM circulants pour générer des résidus de chylomicrons qui seront captés par le foie.¹¹

Figure 3 : Homéostasie du cholestérol dans la cellule intestinale



(Selon Levy et al. 2007)

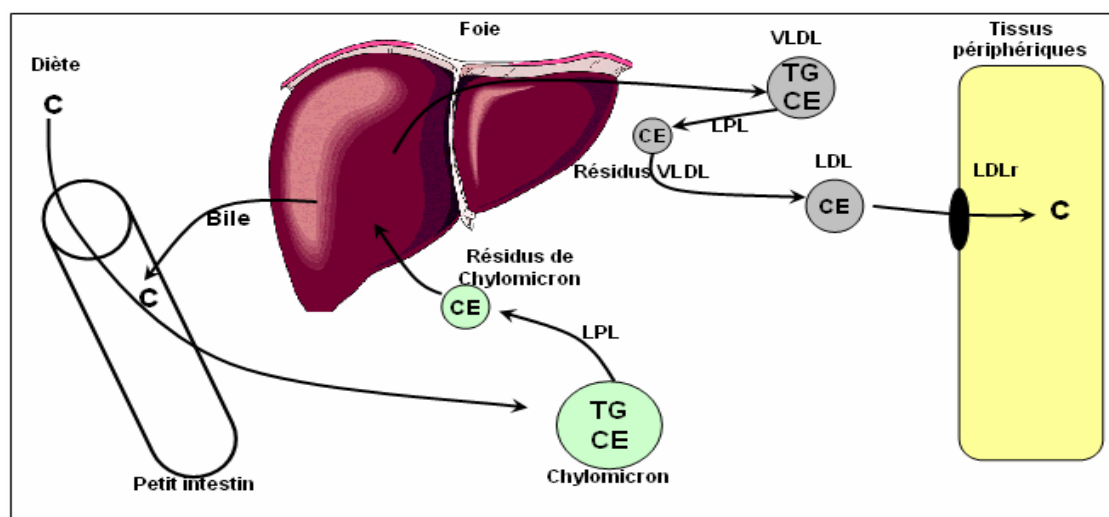
Le cholestérol hépatique, provient principalement de la synthèse *de novo*, dont l'enzyme limitante est la HMG-CoA réductase. Il peut être excrété en tant que tel dans la bile ou sous forme d'acides biliaires. Il a également la possibilité d'être estérifié par l'ACAT et mis en réserve sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytosol, ou bien d'être sécrété de nouveau dans la circulation via les VLDLs qui seront hydrolysées par la LPL au niveau des différents tissus. Les résidus de VLDL formés seront ensuite captés au niveau hépatique ou convertis en lipoprotéine riche en cholestérol, les « low-density lipoproteins » (LDLs). Ce sont les LDLs qui procurent une source substantielle de cholestérol pour la stéroïdogenèse et le maintien des membranes cellulaires. Cela se produit grâce à l'interaction des LDLs circulants à leur récepteur, le récepteur des LDLs (LDLr). C'est également le LDLr situé au niveau du foie qui est en grande partie responsable de la clairance du cholestérol circulant. En effet, bien qu'une minorité du cholestérol se retrouve dans les VLDLs, environ les deux tiers du cholestérol plasmatique sont transportés dans les LDLs tandis que l'autre tiers circule dans les HDLs. Les HDLs sont sécrétés par le foie et l'intestin ou formés par la dégradation des CM et des VLDLs sous l'action de la LPL.

Les HDLs ont un contenu faible en cholestérol lors de leur formation, et ont pour fonction de transporter le cholestérol ester en excès des tissus périphériques (par exemple les macrophages) vers le foie, où ils seront captées par le récepteur SR-B1.¹² C'est ce qu'on appelle le transport inverse du cholestérol, et c'est en partie cette capacité à transporter le cholestérol en excès qui donne aux HDLs leur propriété cardioprotectrice.¹² Le foie est le seul organe capable d'éliminer le cholestérol de l'organisme. Il peut l'excréter directement dans la bile ou l'incorporer dans la formation des acides biliaires. En effet, lorsqu'il y a un excès de cholestérol dans les hépatocytes, ces derniers vont produire des oxystérols qui vont favoriser la transcription de la 7 α -hydroxylase, l'enzyme clé pour la formation des acides biliaires à partir du cholestérol. Après avoir rempli leur fonction de digestion au niveau de l'intestin, environ 10% des acides biliaires sont excrétés dans les selles tandis que 90% sont réabsorbés puis retournés au foie par le cycle entéro-hépatique du cholestérol, pour être renvoyés de nouveau dans la bile.¹³ La voie métabolique des acides biliaires contribue par conséquent à l'élimination du cholestérol.

Le transport du cholestérol est donc un processus complexe dans le maintien de l'homéostasie des stérols faisant intervenir de nombreuses protéines, dont les événements décrits plus haut sont représentés dans la figure 4. En effet, les transporteurs responsables de l'absorption intestinale et de la capture hépatique du cholestérol, ainsi que les différentes enzymes permettant la synthèse *de novo* et l'estérification du cholestérol doivent agir de concert pour maintenir les taux de cholestérol plasmatiques à des niveaux adéquats. La régulation de ces protéines est effectuée grâce à différents facteurs de transcription, tels que les « Sterol regulatory elements binding protein » (SREBPs), les « Liver X Receptors » (LXRs) et les « Peroxisome proliferator-activated receptors » (PPARs), tous impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Une altération hépatique ou intestinale de ce transport peut donc avoir des répercussions majeures sur la santé puisque plusieurs études

épidémiologiques ont établi un lien direct entre les taux de cholestérol plasmatiques et les risques de développer des maladies cardiovasculaires.¹⁴

Figure 4 : Transport entéro-hépatique du cholestérol



(Adapté de Oram & Vaughan, 2006)

1.2.1 Transporteurs du cholestérol impliqués dans l'absorption intestinale et la capture hépatique du cholestérol.

L'absorption intestinale du cholestérol a longtemps été considérée comme étant un processus passif. Par contre, depuis quelques années, on sait que ce transport, permettant d'acheminer le cholestérol de la lumière intestinale à la circulation, est un mécanisme saturable révélant de nombreuses variations d'un individu à l'autre.⁸ À la suite de cette observation, les travaux intensifs de plusieurs groupes de recherches ont permis d'identifier et de caractériser différentes protéines impliquées dans l'absorption du cholestérol au niveau de la bordure en brosse des cellules intestinales.^{15, 16} Parmi ces transporteurs, on retrouve entre autres le SR-B1, NPC1-L1, CD36, et le complexe ANAX2/CAV-1, qui semblent tous jouer un rôle plus ou moins important dans l'absorption intestinale et la capture hépatique du cholestérol.¹⁶ On retrouve aussi les protéines ABCA1 et ABCG5/8 qui contribuent à l'excrétion du cholestérol hors de la cellule. L'implication exacte de ces

protéines dans le transport du cholestérol et les interactions que peuvent avoir ces protéines les unes sur les autres demeurent toutefois peu connues.¹⁷

1.2.1.1. Les «Scavenger Receptors» SRs

Les protéines «scavenger receptor» (SRs), situées à la surface membranaire des cellules, peuvent lier une multitude de ligands, dont les lipoprotéines modifiées telles que les LDLs acétylés et les LDLs oxydés, ainsi que les cellules apoptotiques.¹⁸ Il y a plusieurs classes de SRs divisées en plusieurs types selon les différences structurales. En plus d'avoir un rôle dans le transport des lipides, les SRs ont également pour fonction la défense de l'hôte et la régulation de l'immunité acquise.¹⁹ Dans ce mémoire, la famille de SRs étudiée sera celle de la classe B, comprenant entre autres SR-B1 et CD36, deux récepteurs reconnus pour leur implication dans le transport des lipides et du cholestérol.

1.2.1.1.1 Le «Scavenger Receptors class B type 1» SR-B1

Le récepteur SR-B1 est une glycoprotéine membranaire de 82-85 kDa, exprimée dans plusieurs tissus et types cellulaires incluant le cerveau, l'intestin, les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les kératinocytes, les adipocytes, les plaquettes et les cellules placentaires.²⁰ De plus, il est exprimé en très grande quantité au niveau des tissus dépendant du cholestérol provenant des HDLs, soit le foie et les tissus impliqués dans la stéroïdogénèse, c'est-à-dire, les glandes adrénales, les ovaires et les testicules.^{20, 21} SR-B1 joue un rôle important dans le métabolisme des HDL et le transport inverse du cholestérol.²² C'est l'équipe de Krieger²³ qui a été la première à cloner SR-B1 en 1994, grâce à son homologie au récepteur éboueur de la même famille CD36. Ils ont d'abord identifié la protéine comme étant un récepteur des LDL et des LDL oxydés et acétylés. Par la suite, SR-B1

s'est révélé être un récepteur des phospholipides anioniques, des cellules apoptotiques, puis finalement des HDLs.^{24, 25}

SR-B1 se lie au HDL avec une très grande affinité et capte sélectivement les esters de cholestérol (EC) présent dans ces lipoprotéines pour l'incorporer aux différents tissus.²¹ L'inactivation de SR-B1 est associée à une altération du métabolisme des HDLs et à une diminution de l'accumulation des EC au niveau des tissus producteurs des hormones stéroïdiennes et du foie. Des travaux, réalisés sur des souris surexprimant SR-B1 au niveau du foie, ont montré une diminution dramatique des taux de HDLs plasmatiques et une augmentation importante du cholestérol hépatique et biliaire.^{26, 27} En fait, SR-B1 serait responsable de la captation hépatique de 68% à 85% des EC en provenance des HDLs, mais également des LDLs.²⁸ Contrairement aux souris surexprimant la protéine, les souris déficientes en SR-B1 ont des taux de HDLs plasmatiques beaucoup plus élevés que les animaux contrôles, ainsi qu'une diminution importante du cholestérol biliaire.^{29, 30} Ces résultats suggèrent que le récepteur SR-B1 joue un rôle crucial dans le transport inverse du cholestérol et le métabolisme des lipoprotéines, principalement des HDLs au niveau hépatique.

Au niveau intestinal, SR-B1 est une des premières protéines identifiées à être impliquée dans le transport actif du cholestérol. Elle est particulièrement abondante dans la partie proximale de l'intestin (jéjunum) où l'absorption du cholestérol est essentiellement effectuée.^{9, 17} C'est Hauser et ses collègues qui sont les premiers à avoir démontré une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol en utilisant un anticorps bloquant anti-SR-B1 et un ligand compétitif de SR-B1 chez le lapin.³¹ Par contre, l'importance de SR-B1 dans l'absorption intestinale du cholestérol a été grandement remise en cause lorsque des expériences menées sur des souris déficientes en SR-B1 n'ont pas montré de différences dans l'absorption intestinale du cholestérol.^{32, 33} Par la suite, deux autres études ont confirmé le rôle de SR-B1 dans l'absorption intestinale du

cholestérol. La première étude a montré une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol chez des souris transgéniques surexprimant SR-B1³⁴, tandis que la seconde, a mis en relief le rôle de SR-B1 dans l'absorption du cholestérol en utilisant des cellules Caco-2 invalidé pour le SR-B1.³⁵ Finalement, une équipe de Cincinnati³⁶, a révélé qu'un neutraliseur de SR-B1, administré à des souris déficientes en NPC1-L1, un candidat majeur dans l'absorption intestinale du cholestérol, diminue l'affinité du cholestérol à lier la bordure en brosse de l'intestin. Il semble que la discordance des résultats observés dans la littérature peut s'expliquer par des effets compensatoires exercés par plusieurs protéines transporteurs tels que le NPC1-L1, mais également le CD36, le complexe ANAX2/CAV-1 et les ATP-cassettes, qui sont tous reconnus pour potentiellement jouer un rôle dans l'absorption intestinale du cholestérol.^{9, 37}

1.2.1.1.2 «Fatty acid translocase/cluster of differentiation 36» FAT/CD36

CD36 est une glycoprotéine membranaire de 88 kDa également membre de la famille des SRs, identifiée pour la première fois dans les monocytes/macrophages et par la suite isolée dans les plaquettes sanguines.³⁸ Elle est exprimée dans plusieurs types cellulaires, comme les cellules endothéliales des capillaires, les érythroblastes, les adipocytes, les cellules épithéliales de l'intestin (microvillosités), les cellules rétinienne et les cellules des glandes mammaires.^{9, 38} C'est une protéine qui lie plusieurs molécules (multi ligand) et qui montre une très bonne affinité pour les lipides, suggérant ainsi un rôle dans leur absorption.³⁸

Le rôle de CD36 est déjà bien établi en ce qui a trait au transport des acides gras. En effet, des souris déficientes en CD36 ont montré un défaut dans la prise et l'utilisation des acides gras au niveau des muscles squelettiques et du tissu adipeux ainsi qu'une inhibition de la formation des cellules spumeuses. De plus, elles ont des taux plasmatiques de

triacylglycérols, d'acide gras et de cholestérol plus élevés que les animaux contrôles.³⁹ Les souris surexprimant CD36 au niveau des muscles ont quant à elles montré une augmentation de l'oxydation des acides gras et par le fait même, des taux d'acide gras et de triacylglycérols sérique plus bas, ainsi qu'une diminution du contenu de triacylglycérols dans les VLDL.⁴⁰ Le rôle de CD36 au niveau des macrophages et des cellules musculaires est bien connu, mais il reste encore beaucoup de travail à faire pour bien comprendre sa fonction hépatique et intestinale. Une étude menée sur des souris transgéniques, surexprimant CD36 a toutefois montré une augmentation importante des acides gras et des triacylglycérols hépatiques comparativement aux contrôles.⁴¹ Par contre, aucune différence n'a été observée en ce qui concerne les taux de cholestérol hépatiques chez ces animaux. Au niveau des acides gras alimentaires, les études n'ont pas été capables de confirmer le rôle de CD36 dans leur absorption intestinale.^{42, 43} Malgré tout, CD36 semble favoriser la formation des chylomicrons et pourrait jouer un rôle dans l'absorption intestinale des lipides même si son absence ne suffit pas à diminuer cette absorption.³⁸ Effectivement, plusieurs mécanismes compensatoires peuvent masquer le rôle de CD36 dans l'absorption intestinale des graisses.

Peu d'évidences sont disponibles, en ce qui a trait au rôle de CD36 dans la capture hépatique et l'absorption intestinale du cholestérol. Une étude effectuée par Connelly et ses collègues⁴⁴ prouve que le CD36 est également responsable tout comme le SR-B1, bien qu'à un moindre degré, de la captation du cholestérol ester des HDLs. Toutefois, cette captation sélective du cholestérol n'est pas observée chez des souris surexprimant CD36 au niveau hépatique uniquement.⁴⁵ Les auteurs affirment donc que même si le récepteur éboueur CD36 est capable de lier les HDLs avec une grande affinité, il ne semble pas jouer de rôle majeur dans le métabolisme des lipoprotéines.

Au niveau de l'absorption intestinale du cholestérol, l'équipe de Hauser a observé une inhibition de l'absorption du cholestérol au niveau de la bordure en brosse en présence d'un anticorps bloquant de CD36.⁴⁶ Ces résultats ont également été confirmés par une équipe américaine⁴⁷ avec des souris déficientes en CD36 (CD36^{-/-}). En effet, cette étude a montré que les souris CD36^{-/-} retenaient plus de cholestérol dans la lumière de l'intestin proximal et présentaient une diminution de 50% du cholestérol lymphatique. Les entérocytes de ces souris déficientes ont également été mis en culture et comparativement aux cellules des animaux contrôles, démontrent une diminution de l'absorption du cholestérol d'environ 60%.⁴⁷ Ces résultats diffèrent des études précédemment effectuées sur ces mêmes souris, mais les chercheurs expliquent que la différence est attribuable au segment de l'intestin étudié. Les auteurs ont, entre autres, démontré une régulation à la hausse de NPC1-L1 dans les derniers segments de l'intestin proximal des souris déficientes en CD36, ce qui aurait eu comme effet de compenser le manque de CD36 dans les études précédentes. Ces résultats laissent présager une interaction possible des transporteurs de cholestérol au niveau intestinal, mais des études additionnelles doivent être réalisées afin de mieux comprendre ces interactions et le rôle de CD36 dans l'absorption du cholestérol.

1.2.1.2 « Niemann Pick C1-Like1 » NPC1-L1

C'est la découverte d'un inhibiteur puissant de l'absorption intestinale du cholestérol, l'ezetimibe, qui a grandement facilité l'identification et la caractérisation de la protéine NPC1-L1.⁴⁸ En effet, en réduisant de 15% à 20% le taux de cholestérol plasmatique, cet agent pharmacologique s'est avéré prometteur et méritait une investigation pour en déceler les mécanismes d'action.⁹ Altmann et ses collègues⁴⁹ ont donc fait une analyse exhaustive de 16 500 séquences exprimées au niveau du jéjunum du rat en sélectionnant les régions présentant les caractéristiques relative au transport du cholestérol. Un seul gène candidat s'est démarqué : NPC1-L1 qui partage environ 50%

d'homologie avec NPC1, un gène défectueux dans la maladie de Niemann-Pick caractérisée par l'accumulation de cholestérol dans les lysosomes.⁵⁰ Contrairement à NPC1 qui est exprimé de façon ubiquitaire, le NPC1-L1 est principalement exprimé au niveau intestinal, hépatique et dans une moindre mesure au niveau de la vésicule biliaire, de l'estomac, des testicules et des ovaires.⁵¹ Sur le plan intestinal, le NPC1-L1 est retrouvé en plus grande quantité au niveau du duodénum et du jéjunum, où l'absorption du cholestérol est plus importante, tandis qu'elle est faiblement exprimée au niveau de l'iléon.⁵¹

Après avoir identifié la protéine, Altmann et ses collègues ont généré des souris déficientes en NPC1-L1 afin d'en comprendre les fonctions.⁴⁹ Ils n'ont constaté aucun changement morphologique de l'intestin et aucune différence n'a été observée dans les niveaux de cholestérol et de triacylglycérol plasmatiques. Par contre, une réduction de l'absorption intestinale de 69% a été observée chez les souris n'exprimant pas le transporteur NPC1-L1.⁴⁹ Cette protéine semble donc jouer un rôle essentiel dans l'absorption du cholestérol au niveau de la bordure en brosse du jéjunum. De plus, les souris déficientes en NPC1-L1 et traitées à l'ezetimibe n'ont pas vu l'absorption intestinale de cholestérol diminuer contrairement aux animaux contrôles, ce qui semble valider le rôle du NPC1-L1 dans le transport du cholestérol et sa sensibilité à l'ezetimibe.⁴⁹ Ces résultats sont confirmés par une étude exécutée sur des cellules intestinales, qui montre également que l'ezetimibe se lie sur un site unique de la membrane cellulaire, en occurrence le NPC1-L1.⁵²

Bien que plusieurs chercheurs se soient penchés sur la compréhension de ce transporteur, la localisation cellulaire exacte de NPC1-L1 au niveau de l'intestin reste néanmoins sujet à divers débats. Certaines études indiquent que NPC1-L1 est située à la surface cellulaire des entérocytes⁴⁹ et des cellules Caco-2.⁵³ Tandis que d'autres décrivent NPC1-L1 comme étant une protéine intracellulaire.⁵⁴ Une étude menée dans notre laboratoire sur des cellules

Caco-2 a cependant démontré par immunofluorescence et immunocytochimie que la protéine NPC1-L1 est présente au niveau de la bordure en brosse des cellules ainsi qu'au niveau de différents compartiments intracellulaires tels que les lysosomes et les mitochondries.⁵¹ Des études doivent encore être effectuées pour comprendre la fonction exacte de NPC1-L1 au niveau de l'intestin, tout en précisant ses « déplacements » entre la membrane apicale et les organelles intracellulaires. En outre, des efforts doivent également être consacrés à la compréhension de l'interaction du NPC1-L1 avec les autres transporteurs.

Si plusieurs interrogations persistent quant au NPC1-L1 au niveau intestinal, la fonction du NPC1-L1 au niveau hépatique n'est pas plus évidente. C'est un groupe de recherche en Suisse qui a montré que le NPC1-L1 est localisé au niveau de la membrane caniculaire des hépatocytes de singe et que son expression facilite la capture de cholestérol libre des cellules HepG2 en culture.⁵⁵ Ces premiers résultats laissent supposer que NPC1-L1 jouerait un rôle dans l'excrétion du cholestérol dans la bile en contrebalançant l'effet des transporteurs ABCG5 et ABCG8. Afin de vérifier cette hypothèse, deux lignées de souris transgéniques surexprimant la protéine NPC1-L1 humaine au niveau hépatique uniquement ont été générées. Les souris surexprimant NPC1-L1 ont montré une réduction importante du cholestérol biliaire et une augmentation du taux de cholestérol plasmatique comparativement aux souris contrôles. Ces taux sont ramenés à la normale lorsqu'on donne l'ezetimibe, l'inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol, aux animaux transgéniques.⁵⁶

Les résultats décrits au niveau intestinal et hépatique sont également confirmés par Davies et ses collègues qui ont montré que les souris déficientes en NPC1-L1 sont résistantes à l'hypercholestérolémie induite par une diète riche en cholestérol.⁵⁷ Le transporteur NPC1-L1 est donc un intervenant important dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol. Le foie, tout

comme l'intestin, peut être une cible thérapeutique de l'ezetimibe et diminuer les taux de cholestérol plasmatiques.⁵⁶

1.2.1.3 Annexine II/Caveoline-1 (ANAX2/CAV-1)

Les cavéoles sont de petites invaginations qui abondent à la surface de plusieurs cellules. Elles participent à une multitude de fonctions cellulaires incluant l'endocytose, la transcytose et le transport du cholestérol.⁵⁸ La principale protéine constitutive des cavéoles est CAV-1. Tout comme la CAV-1, ANAX2, une protéine cytosolique liée à la membrane plasmique, est également associée aux cavéoles et a des vésicules intracellulaires.⁵⁸ En effet, des études ont montré que le domaine N-terminal de l'ANAX2 se lie à des domaines membranaires riches en cholestérol tels que les cavéoles et que sa localisation cellulaire est modulée par la distribution du cholestérol.^{59, 60}

Un rôle d'ANAX2 dans l'absorption intestinale du cholestérol a été rapporté par Smart et ses associés.³⁷ Ils ont démontré que l'ANAX2, capable de former un hétérocomplexe stable avec la protéine CAV-1 dans le cytosol des cellules intestinales du poisson zèbre et de la souris, serait une cible de l'ezetimibe. Cependant, les débats persistent en ce qui concerne le rôle du complexe ANAX2/CAV-1 dans le métabolisme du cholestérol et sa capacité à lier l'ezetimibe. En effet, une étude menée sur des souris déficientes en CAV-1 a démontré que l'absence de cette protéine ne change pas l'absorption intestinale du cholestérol.³⁷ Les auteurs ont également montré que l'inhibition de l'absorption intestinale par l'ezetimibe ne nécessite pas la présence de la CAV-1. Une autre équipe a aussi confirmé ces observations chez le lapin, en montrant que l'ezetimibe ne se lie pas à ANAX2, à CAV-1 ou au complexe ANAX2/CAV-1.⁶⁰ Ces résultats laissent supposer que la protéine ANAX2 n'est pas directement impliquée dans l'absorption intestinale du cholestérol.

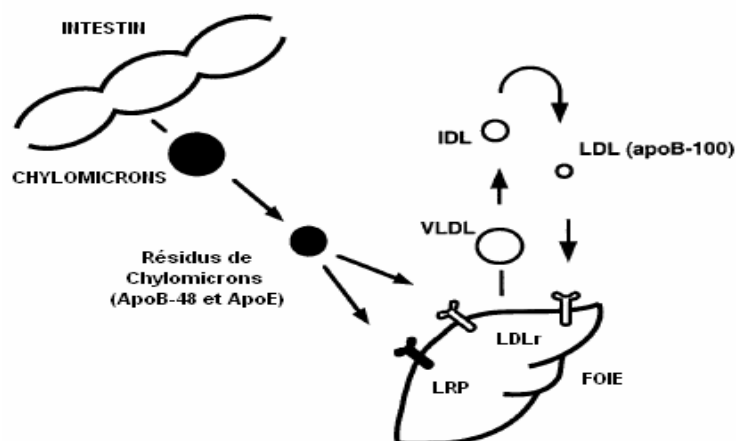
Au niveau hépatique, le rôle de ANAX2 et/ou du complexe ANAX2/CAV-1 dans le transport du cholestérol n'est pas très bien documenté dans la littérature. Quoi qu'il en soit, même si son mécanisme de liaison dépendant du cholestérol n'est pas vraiment caractérisé, ANAX2 pourrait interagir directement avec le cholestérol et participer au transport intracellulaire du cholestérol entre les différents compartiments de la cellule.^{61, 62}

1.2.1.4 « Low-density-lipoprotein receptor » LDLr et la « protein convertase subtilisyn/kinase 9 » PCSK9

Les LDLs sont des lipoprotéines riches en cholestérol, qui transportent les deux tiers du cholestérol plasmatique. Contrairement aux chylomicrons et aux VLDLs, qui subissent une hydrolyse partielle au niveau des tissus périphériques, les LDLs se lient avec une grande affinité à leur récepteur situé au niveau de la membrane cellulaire : le récepteur des LDLs (LDLr).⁶³

Le récepteur des LDLs lie les lipoprotéines riches en cholestérol, qui contiennent l'apo B-100 et/ou apo E puis entraîne leur internalisation. Les lipoprotéines ainsi internalisées par le LDLr sont incorporées dans des vésicules d'endocytose qui vont fusionner avec les lysosomes. Dans les lysosomes, les apo sont dégradées en acides aminés, puis le cholestérol est relâché dans le cytosol après avoir été hydrolysé.⁶⁴ Cette capture des lipoprotéines par le LDLr est capitale dans l'homéostasie du cholestérol. En fait, c'est par ce processus que le cholestérol nécessaire au maintien de la fonction cellulaire est apporté aux cellules (par exemple pour les tissus stéroïdogéniques).⁶⁴ Cela permet également de contrôler la concentration de cholestérol plasmatique.

Figure 5 : La capture hépatique des lipoprotéines contenant l'apoB et l'apoE par le récepteur des LDLs



(Adapté de Willnow, 1998)

La fonction du LDLr est bien établie depuis plusieurs années. Même si le LDLr est présent au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes, on n'attribue pas à l'intestin une part substantielle dans l'homéostasie du cholestérol. En fait, c'est plutôt au foie que ce rôle revient. La voie d'excrétion majeure du cholestérol, s'effectue dans la bile par les cellules hépatiques.⁶⁶ Cette activité est diminuée si le LDLr est supprimée. Dans ce cas, il y a une augmentation des LDLs et des résidus de VLDLs circulants, et l'association avec développement des maladies cardiovasculaires devient étroite.⁶⁶

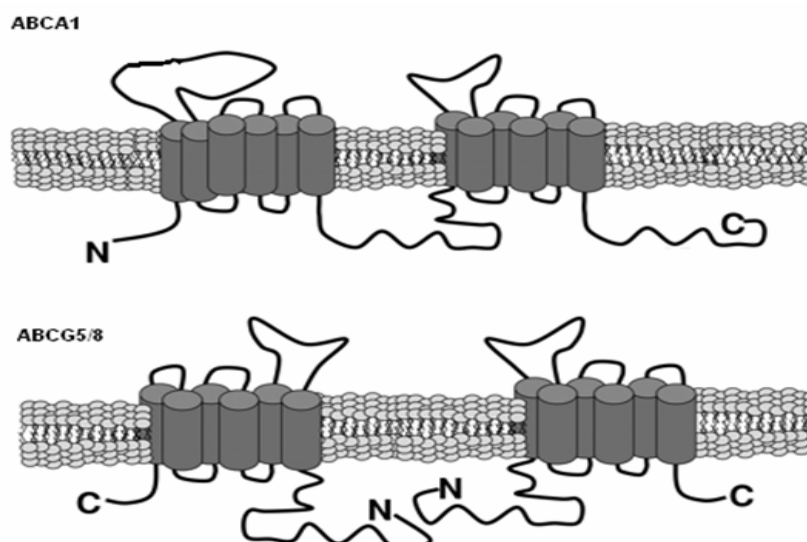
Les mécanismes de régulation transcriptionnelle du LDLr seront discutés plus en détails dans une section suivante. Néanmoins, il est important de mentionner que la « proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 » (PCSK9) est impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle du LDLr. La PCSK9 est une glycoprotéine hautement exprimée au niveau du foie, du petit intestin, des reins et du cerveau, dont la transcription est régulée de la même façon que le LDLr. En effet, lorsqu'il y a une diminution du cholestérol cellulaire, différentes voies sont activées pour entraîner une augmentation de l'expression protéique du LDLr et de la PCSK9. Toutefois, contrairement au LDLr qui favorise la clairance des LDLs circulants, la PCSK9 a des effets opposés sur la

concentration de cholestérol plasmatique puisqu'elle entraîne la dégradation de ce récepteur. Un polymorphisme de cette protéine peut donc avoir des conséquences majeures sur les taux de cholestérol sanguin et provoquer une hypercholestérolémie.⁶⁵

1.2.1.5 « ATP-binding cassette protein » (ABC)

Les ATP-binding cassettes constituent une des plus grandes familles de protéines qui se sont conservées au cours de l'évolution des espèces.⁶⁷ Le génome humain comporte 48 transporteurs ABC différents, groupés en 7 sous-classes s'étendant de ABCA jusqu'à ABCG.⁶⁷ Les protéines membres de cette famille sont de grosses protéines transmembranaires qui transportent une multitude de substrats à travers les membranes extracellulaires et intracellulaires, incluant des sucres, des acides aminés, des peptides, des protéines, des lipides, des médicaments et autres métabolites hydrophobes.⁶⁷ Ils sont essentiels au bon fonctionnement de plusieurs processus cellulaires et une mutation ou altération de ces gènes peut entraîner différentes pathologies génétiques, telles que la fibrose kystique, l'anémie et des désordres du transport des lipides. Ces transporteurs utilisent tous l'ATP pour générer l'énergie dont ils ont besoin et ils sont classifiés justement en se basant sur la séquence et l'organisation du domaine de liaison de l'ATP.⁶⁷ Les protéines ABCs se divisent en deux groupes sur le plan structurel : une seule protéine ayant 2 unités similaires jointes par des liens covalents et un demi-transporteur (une seule unité) formant un homodimère ou un hétérodimère actif.⁶⁷ Plusieurs protéines, au moins 7 membres, de cette famille sont impliquées dans le métabolisme du cholestérol au niveau de l'intestin. Mais dans le cadre de ce projet, nous nous attarderons uniquement aux transporteurs ABCA1, responsables de l'exportation du cholestérol cellulaire et autres métabolites lipidiques vers les HDL et aux protéines ABCG5 et ABCG8 qui forment un hétérodimère pour permettre l'excrétion du cholestérol dans la lumière intestinale et dans la bile par le foie.⁶⁸

Figure 6 : Structure de l'ABCA 1 et de l'ABCG 5/8



(Adapté de Oram & Vaughan, 2006)

1.2.1.5.1 «ATP-binding cassette transporter A1» *ABCA1*

ABCA1 est une très grosse protéine exprimée dans plusieurs tissus. Chez l'homme, cette ATP-cassette est le plus abondamment exprimée dans le foie, le placenta, le petit intestin et les poumons, tandis que chez la souris c'est au niveau du foie, des reins, des glandes adrénales, du cœur, des testicules et du cerveau qu'on la retrouve en plus grande quantité.⁶⁷ L'ABCA1 comprend douze domaines transmembranaires : une région N-terminale cytosolique et deux larges loupes extracellulaires hautement glycosilées.⁶⁷

Depuis quelques années, on sait que le transporteur ABCA1 participe à l'efflux du cholestérol des cellules intestinales, mais sa contribution majeure au niveau des pôles de l'entérocyte (apical versus basolatéral) a longtemps été l'objet d'investigation. Grâce à diverses études, on sait maintenant que l'ABCA1 régule l'efflux de cholestérol intestinal via la membrane basolatérale.⁶⁹ En effet, cette protéine est située sur la membrane apicale des entérocytes, ce qui laisse croire qu'elle ne joue pas directement dans l'absorption du cholestérol de la lumière intestinale. Cette protéine transporte cependant le

cholestérol, les phospholipides et d'autres molécules lipophiles à travers la membrane cellulaire pour les lier à l'apolipoprotéine A-I, et permettre la formation des HDL intestinaux.^{69, 70} En fait, l'ABCA1 formerait un canal dans la membrane facilitant le « flopping » des lipides de la membrane interne vers la membrane externe de façon ATP-dépendante.⁷⁰ Une étude effectuée sur des souris déficientes en ABCA1 intestinale a montré que cette protéine contribue à la formation de 30% des HDL plasmatiques totaux, suggérant une contribution non négligeable de ce transporteur dans la biogénèse de ces lipoprotéines.⁷¹

Au niveau hépatique, l'ABCA1 s'emploie également à former une portion des HDLs plasmatiques. Afin d'étudier l'implication de cette protéine, une équipe a généré des souris transgéniques surexprimant ABCA1 uniquement au niveau du foie.⁷² Comparativement aux animaux contrôles, les souris transgéniques ont présenté des taux de HDL de 2 à 3 fois plus élevés. De plus, la surexpression de l'ABCA1 a entraîné un changement compensatoire de l'expression génique de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme hépatique du cholestérol tels que la HMG-CoA réductase et le LDLr.⁷² Une étude menée sur des hépatocytes de souris en culture, déficients en ABCA1, a obtenu des résultats similaires. Les chercheurs ont montré que l'ApoA-I exogène favorise l'efflux de cholestérol dans le milieu des hépatocytes exprimant ABCA1 ainsi que les changements compensatoires de certains gènes observés lors d'une surexpression de l'ABCA1, tandis qu'aucune altération de ce genre n'est observable chez les cellules déficientes en ABCA1.⁷³ Ces études suggèrent donc que la mobilisation hépatique du cholestérol pour favoriser la formation des HDLs est un mécanisme dépendant de l'ABCA1.

En l'absence d'ABCA1 ou lorsqu'il y a une mutation du gène, comme c'est le cas dans la maladie de Tangier par exemple, une déficience de l'efflux de cholestérol s'installe, ce qui empêche la formation des HDLs.

Conséquemment, le cholestérol ester s'accumule dans les tissus, incluant les macrophages, révélant ainsi une perte de l'homéostasie des lipides qui entraîne la formation progressive de l'athérosclérose.^{71, 72, 74} La protéine ABCA1 est indubitablement un intervenant majeur dans le maintien de l'homéostasie cellulaire du cholestérol et dans la synthèse des HDLs.

1.2.1.5.2 «ATP-binding cassette transporter G5/G8» ABCG5 et ABCG8

Un des transporteurs ABC de la sous-famille G ne devient fonctionnel que lorsque deux demi-transporteurs se lient. Les deux unités ABCG5 et ABCG8 sont principalement localisées sur la membrane apicale des cellules intestinales et sur la membrane caniculaire des hépatocytes.⁷⁵ Ces protéines formées de 6 domaines transmembranaires, s'hétérodimérisent en un complexe fonctionnel pour permettre l'excrétion à la fois des stérols végétaux et du cholestérol vers la lumière intestinale et dans la bile.⁷⁵

Au niveau de l'intestin, le transporteur ABCG5/8 pompe de façon active aux dépend de l'ATP, les stérols végétaux et le cholestérol des entérocytes vers la lumière intestinale.⁷⁵ Le travail effectué chez des souris surexprimant ABCG5/8 a montré que les animaux transgéniques retenaient beaucoup moins le cholestérol et les stérols d'origine végétale que les souris de type sauvages et que cela pouvait être attribuable à la diminution de l'absorption de ces stérols au niveau intestinal.⁷⁶ Pour appuyer ce fait, une autre étude effectuée sur des souris déficientes en ABCG5/8 a montré que l'absorption de stérols de ces animaux est deux à trois fois plus importante que chez les souris contrôles.⁷⁷ Plus récemment, une équipe japonaise a confirmé le rôle de ces transporteurs sur les cellules humaines Caco-2. Les auteurs ont de plus montré que la présence des acides biliaires dans la lumière intestinale favorise l'efflux de cholestérol hors des entérocytes, tout comme l'apo-A1 favorise la sortie du cholestérol au niveau basolatérale des cellules via l'ABCA1.⁷⁸

Pour ce qui est du rôle de ces protéines au niveau du foie, des expériences menées sur des souris transgéniques ont révélé qu'une surexpression hépatique de ABCG5/8 favorise l'excrétion hépatobiliaire du cholestérol et des stérols végétaux.⁷⁹ Les auteurs de cette étude n'ont, cependant, remarqué aucun changement dans le profil lipidique de ces animaux bien que la concentration plasmatique des stérols végétaux ait connue une baisse d'environ 25%.⁷⁹ D'autres études effectuées sur des souris ont également obtenu des résultats semblables, documentant même une relation linéaire entre l'expression hépatique d'ABCG5/8 et les taux de sécrétion de cholestérol et des stérols végétaux dans la bile.^{80, 81} Une diminution majeure de la concentration de cholestérol dans la bile a de plus été observée chez des souris déficientes en ABCG5/8.⁷⁷

L'hétérodimère ABCG5/8 contribue significativement à la sécrétion hépatobiliaire du cholestérol et de son retour dans la lumière intestinale.⁸² Ces gènes sont essentiels à l'excrétion du cholestérol de notre organisme et intensifient la protection contre le développement de l'athérosclérose en empêchant une trop grande accumulation de stérols dans notre corps.⁸² Une mutation sur une des deux unités de l'ABCG5/8 peut causer la sitostérolémie, un rare désordre autosomal récessif, caractérisé par une accumulation de cholestérol et de stérols végétaux dans le sang et les tissus, entraînant l'imergence de maladies cardiovasculaires précoces.⁸²

Le transport du cholestérol est un processus dynamique primordial au maintien de l'homéostasie du cholestérol.⁹ Les transporteurs qui y sont impliqués jouent des rôles essentiels dans l'absorption intestinale, la capture hépatique et l'excrétion du cholestérol. Toutefois, plusieurs études seront encore nécessaires afin de comprendre les interactions entre ces protéines, leur régulation et les fonctions exactes de chacune d'elles, que ce soit au niveau de l'intestin, du foie ou des autres tissus.

Outre ces transporteurs, une panoplie d'autres gènes est aussi impliquée dans le transport du cholestérol. On y retrouve certaines enzymes, comme la HMG-CoA réductase et l'ACAT, ainsi que plusieurs facteurs de transcriptions responsables de la régulation de nombreuses protéines impliquées dans l'absorption, la capture, la synthèse *de novo* et l'excrétion du cholestérol, tel que les SREBPs, les LXRs et les PPARs.⁹

1.2.2 Enzymes impliquées dans le transport du cholestérol

Le transport du cholestérol est un mécanisme complexe faisant intervenir une multitude d'enzymes microsomales, telles que la HMG-CoA réductase, qui est l'enzyme clé de la synthèse *de novo* du cholestérol et l'ACAT, essentielle à l'estérification du cholestérol et à la formation et sécrétion des lipoprotéines.

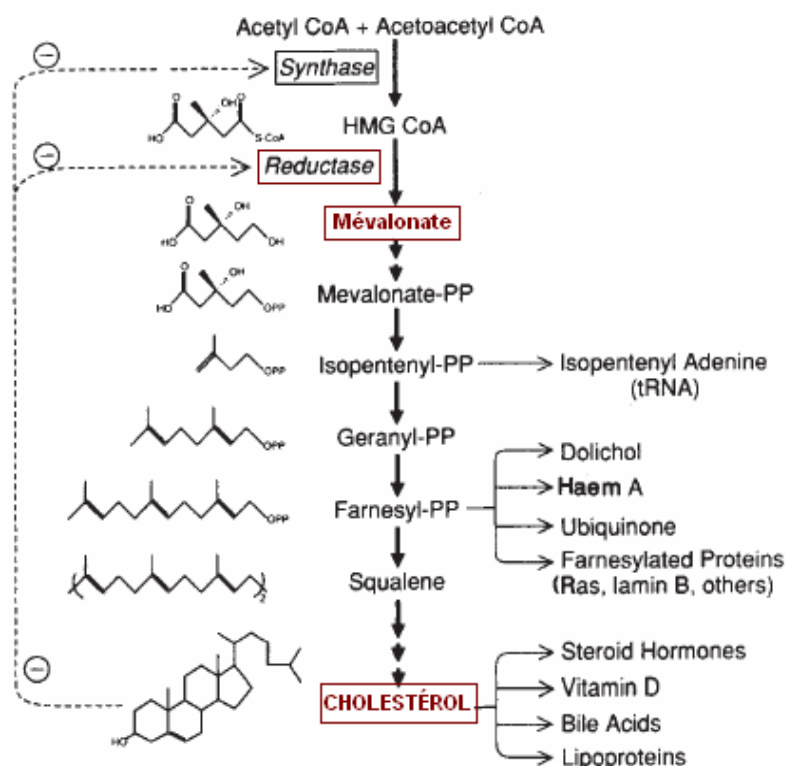
1.2.2.1 «3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase» HMG-CoA reductase

L'enzyme HMG-CoA réductase est une glycoprotéine transmembranaire d'environ 97 kDa, située au niveau du réticulum endoplasmique possédant deux domaines structuraux distincts. Le domaine COOH-terminale permet la fonction catalytique, tandis la partie NH₂-terminal permet l'encrage à la membrane du réticulum endoplasmique.⁸³ Même si elle est présente dans presque tous les tissus, la protéine HMG-CoA réductase est plus abondamment exprimée au niveau du foie et de l'intestin, connus pour leur implication dans la régulation du métabolisme du cholestérol.⁸³

La HMG-CoA réductase catalyse la conversion de HMG-CoA en mévalonate qui est ultimement impliqué dans la synthèse *de novo* du cholestérol⁸⁴ (voir figure 7). Cette synthèse débute par la condensation de trois molécules d'acétate en hydroxy-méthyl-glutarate (HMG). Par la suite, le HMG sera converti en HMG-CoA par la HMG-CoA synthase. Ce produit sera ensuite

réduit par la HMG-CoA réductase en mévalonate qui sera décarboxylée en isoprénoïdes à 5 carbones. La condensation de 6 molécules d'isoprénoïdes aboutit au squalène (30 carbones) qui subit finalement l'action de la squalène cyclase qui crée les cycles du cholestérol.⁸⁴

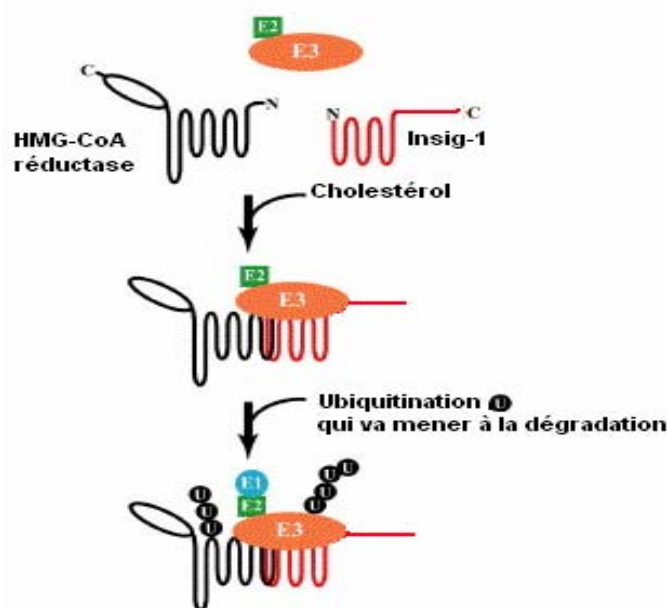
Figure 7 : La synthèse du cholestérol par la voie de l'HMG-CoA réductase



(Adapté de Friesen et al. 2004)

L'enzyme HMG-CoA réductase est hautement régulée et sujette à divers contrôles transcriptionnels, translationnels et post-transcriptionnels.⁸⁵ Lorsqu'il y a une accumulation de cholestérol dans les tissus, l'activité de la HMG-CoA réductase est inhibée.⁸⁵ En effet, une accumulation de cholestérol dans la membrane du réticulum endoplasmique provoque la liaison de la HMG-CoA réductase avec la protéine « Insulin-induced gene 1 » (Insig-1), qui mène à une ubiquitination et par le fait même à la dégradation de l'enzyme par le protéasome^{85, 86} (voir figure 8). Par contre, lorsqu'il y a une déplétion cellulaire du cholestérol, l'activité de la protéine est augmentée.⁸⁶

Figure 8 : Ubiquitination de la HMG-CoA réductase associée à la liaison de la protéine Insig-1



(Adapté de Song et al. 2005)

1.2.2.2 «Acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransférase» ACAT

L'ACAT joue un rôle très important dans la régulation du cholestérol plasmatique. C'est une enzyme intracellulaire localisée dans le réticulum endoplasmique rugueux qui a pour fonction de catalyser l'estérification du cholestérol avec des acides gras à longue chaîne.⁸⁷ L'ACAT est reconnue pour être impliquée dans l'absorption intestinale du cholestérol, dans la formation hépatique et intestinale des lipoprotéines et dans la mise en réserve du cholestérol dans des gouttelettes cytoplasmiques principalement au niveau des tissus stéroïdogéniques.⁸⁷ Elle favorise cependant la formation des cellules spumeuses qui accélèrent la constitution des plaques d'athérosclérose.^{87, 88}

Deux enzymes ACAT avec des caractéristiques enzymatiques semblables dans la plus part des cas ont été identifiées à ce jour : l'ACAT-1 et l'ACAT-2.⁸⁹ L'ACAT-1 est exprimée de façon ubiquitaire, tandis que l'ACAT-2

est principalement exprimée au niveau de l'intestin chez l'humain et au niveau du foie chez le rat et la souris.⁹⁰ L'ACAT-1 influencerait la mise en réserve du cholestérol, alors que l'ACAT-2 faciliterait la formation et la sécrétion des lipoprotéines.⁹⁰ Dans le cas présent, nous nous attarderons davantage sur les caractéristiques de l'ACAT-2 en vue de son association à la physiopathologie du diabète.⁹¹

1.2.2.2.1 ACAT-2

Au niveau intestinal, l'ACAT-2 serait principalement concentrée dans les microvillosités des entérocytes, entrevoyant son impact dans l'absorption du cholestérol.⁹⁰ Dans ce contexte, une étude a montré que l'absorption intestinale des souris déficientes en ACAT-2 (ACAT-2^{-/-}) est significativement diminuée par rapport aux souris contrôles, lorsque les animaux sont soumis à une diète enrichie en cholestérol et triacylglycérols.⁹² Néanmoins, les souris ACAT-2^{-/-} nourries avec la diète enrichie maintiennent une concentration de cholestérol hépatique similaire aux souris nourries avec une diète normale. Il en est de même pour la synthèse hépatique du cholestérol.⁹² Les souris contrôles nourries avec la diète riche compensent l'apport important de cholestérol en diminuant la synthèse *de novo* du cholestérol et en diminuant l'expression de certains transporteurs tels que les ATP-cassette, ce qui n'est pas le cas chez les souris ACAT-2^{-/-}, où aucun changement régulateur de ce genre n'est observé.⁹² L'ACAT-2 s'implique donc dans la régulation du transport entérohépatique du cholestérol, et une inhibition totale de ce gène semble prévenir l'hypercholestérolémie induite par une diète riche en cholestérol et triacylglycérols.^{91, 93} En effet, lorsque les souris ACAT-2^{-/-} sont croisées avec des modèles de souris susceptibles de développer l'athérosclérose telles que les souris ApoE^{-/-} et LDLr^{-/-}, très peu d'athérosclérose est observée par rapport aux contrôles. De plus, l'augmentation de la masse protéique et de l'activité de l'ACAT-2 affecte le

contenu du cholestérol ester des lipoprotéines contenant l'apoB et corrèle avec l'apparition de lésions athérosclérotiques.⁹⁴

Contrairement à l'HMG-CoA réductase dont la régulation transcriptionnelle du gène est bien documentée, peu de choses sont connues au sujet de l'activation de l'ACAT. Cette activation est cependant stérol-dépendante puisque lorsque le taux de cholestérol libre de la cellule augmente et atteint un seuil, l'ACAT s'active pour estérifier le cholestérol en excès. Pendant longtemps on a cru seulement à une régulation post-transcriptionnelle⁹⁵, mais des expériences effectuées récemment sur des cellules HepG2 ont montré que les taux d'ARNm de l'ACAT-2 sont modulés lorsqu'il y a un surplus ou une déplétion de cholestérol.⁹⁶

1.2.3 Les facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation du transport du cholestérol

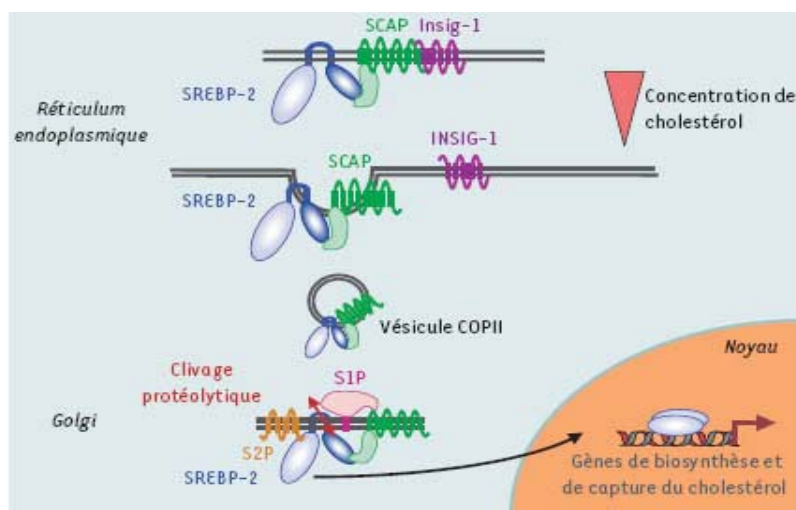
L'homéostasie du cholestérol est maintenue par différentes voies régulatrices contrôlant la synthèse du cholestérol endogène, l'absorption du cholestérol au niveau intestinal et l'élimination du cholestérol et de ses produits cataboliques tels que les acides biliaires. Le contrôle transcriptionnel des gènes impliqués dans ces processus est attribuable à différentes familles de facteurs de transcriptions : les SREBPs, plus spécifiquement SREBP-2, qui contrôlent la production des enzymes responsables de la synthèse du cholestérol ; les LXRs, qui régulent la transcription des gènes impliqués dans l'efflux, la mise en réserve, le catabolisme et l'élimination du cholestérol ; et les PPARs impliqués dans l'absorption du cholestérol, l'adipogenèse et l'oxydation des acides gras.⁹⁷⁻⁹⁹

1.2.3.1 « Sterols-Regulatory-Element-Binding-Protein » SREBPs

La famille des facteurs de transcriptions SREBPs active la transcription de plus de 30 gènes impliqués principalement dans le métabolisme du

cholestérol et des lipides, mais ils contrôlent également les gènes impliqués dans la différenciation des adipocytes et du métabolisme du glucose.⁹⁷ Lorsqu'ils sont synthétisés, ces facteurs de transcriptions restent liés à la membrane du réticulum endoplasmique par deux domaines transmembranaires.⁹⁷ Sous cette forme, ils sont inactifs et ne peuvent initier la transcription. Lorsqu'une déplétion des stérols ou des acides gras polyinsaturés est perçue au niveau du réticulum endoplasmique, la protéine chaperonne « SREBP cleavage-activating protein » (SCAP) escorte SREBP jusqu'à l'appareil de Golgi où deux protéases (« site-1 protease » (S1P) et « site-2 protease » (S2P)) agissent séquentiellement pour libérer la partie N-terminale du facteur de transcription, qui se rendra par la suite au noyau, sous sa forme mature (active) pour lier les séquences d'ADN spécifiques « SREBP response element » (SREs) situés au niveau des promoteurs des gènes cibles et induire pour la plupart d'entre eux, leur transcription¹⁰⁰⁻¹⁰² (voir figure 9).

Figure 9 : Clivage protéolytique de SREBP-2 par SCAP lors d'une déplétion de cholestérol cellulaire



(Adapté de Foufelle et al. 2005)

La famille des SREBPs est constituée de trois différentes protéines, SREBP-1a, SREBP-1c qui sont codées par un même gène SREBF-1 et

SREBP-2 codé par SREBF-2. Ces trois facteurs essentiels à la régulation de la biosynthèse des lipides et du cholestérol en particulier.¹⁰³ Contrairement à SREBP-1c et SREBP-2 qui ont des fonctions plus restrictives, SREBP-1a a le potentiel d'activer tous les gènes ayant une séquence SRE.¹⁰³ Pour ce qui est de SREBP-1c, il active préférentiellement la transcription des gènes responsables de la synthèse des acides gras, tandis que SREBP-2 régule principalement les gènes du métabolisme du cholestérol.⁹⁷ Puisque notre projet est relié au transport du cholestérol, nous nous attarderons uniquement sur le facteur SREBP-2.

1.2.3.1.1 SREBP-2

Le facteur de transcription SREBP-2, exprimé dans tous les tissus, régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'absorption intestinale, la synthèse *de novo* et la capture hépatique du cholestérol.⁹⁷ Une étude menée par Alferai et ses collègues sur des cellules Caco-2, démontre que l'expression génique de NPC1-L1 est augmentée lors d'une déplétion de cholestérol, et diminuée en présence d'oxystérol.¹⁰⁴ Cette régulation peut s'expliquer par l'activation de SREBP-2. En fait, lorsqu'il y a une diminution de cholestérol, SREBP-2 est activé, va au noyau et se lie aux deux séquences SREs (SREN1 et SREN2) du gène NPC1-L1 pour permettre sa transcription.¹⁰⁴ Une autre investigation réalisée sur des souris exprimant une forme tronquée de SREBP-2, insensible à la régulation négative exercée par le cholestérol, a montré que l'expression génique des protéines impliquées dans la biosynthèse du cholestérol, telles que la HMG-CoA réductase est fortement augmentée (environ 75 fois) chez les souris transgéniques.¹⁰⁵ Par contre, une faible augmentation (environ 4 fois) a été observée dans l'expression génique des protéines impliquées dans la synthèse des acides gras.¹⁰⁵ Ces résultats suggèrent que le facteur SREBP-2 est relativement sélectif et qu'il active principalement la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol.

L'activation de SREBP-2 amplifie aussi la transcription du récepteur des LDLs impliqué dans la captation hépatique du cholestérol.¹⁰⁶ C'est le principal isoforme de SREBP à intervenir lorsqu'une demande hépatique de cholestérol se fait sentir.¹⁰⁶ En plus de réguler les gènes impliqués dans l'absorption intestinale, la capture hépatique et la synthèse du cholestérol, SREBP-2 régule, à la hausse, la transcription du gène ABCA 1, responsable de la formation des HDLs.¹⁰⁰ Les auteurs précisent cependant que cette modulation positive de l'ABCA1 est attribuable à la formation des oxystérols, le ligand naturel des LXRs, à travers la régulation de SREBP-2.¹⁰⁰ La mort embryonnaire des souris déficientes en SREBP-2, à cause d'une incapacité à produire suffisamment de cholestérol, suggère que cette protéine est essentielle au maintien de l'homéostasie du cholestérol.¹⁰⁶

1.2.3.2 «Liver X Receptor» LXRs

Le premier facteur LXR humain a été nommé ainsi puisqu'il a initialement été isolé du foie et que son expression est prépondérante dans ce tissu. Cette sous-famille de récepteurs contient deux membres partageant 77% d'homologie, soit le LXR α et le LXR β , qui sont tout deux activés par les oxystérols.¹⁰⁷ Leur activation peut aussi être modulée par la phosphorylation de la protéine kinase A et C impliquées dans la résistance à l'insuline.¹⁰⁸ Ces deux récepteurs sont grandement exprimés dans le système entéro-hépatique, bien qu'ils aient une distribution différente dans les tissus. En effet, LXR β semble être exprimé de façon ubiquitaire tandis que LXR α est retrouvé principalement au niveau du foie et à plus faible concentration dans les autres organes impliqués dans le métabolisme des lipides tels que l'intestin, le tissu adipeux, les reins et les glandes adrénales.^{99, 109} Les récepteurs LXRs sont des intervenants majeurs dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol puisqu'ils répondent à un excès de cholestérol en régulant la transcription de plusieurs gènes clés impliqués dans le métabolisme du cholestérol, principalement dans le transport inverse du cholestérol, en se liant sur la

séquence spécifique « LXR response element » (LXRE) située au niveau du promoteur des gènes cibles.^{110, 111} Pour être fonctionnels, les LXRs doivent obligatoirement former un hétérodimère avec le rétinolide X récepteur (RXR) qui est lui-même lié et activé par l'acide rétinolique.

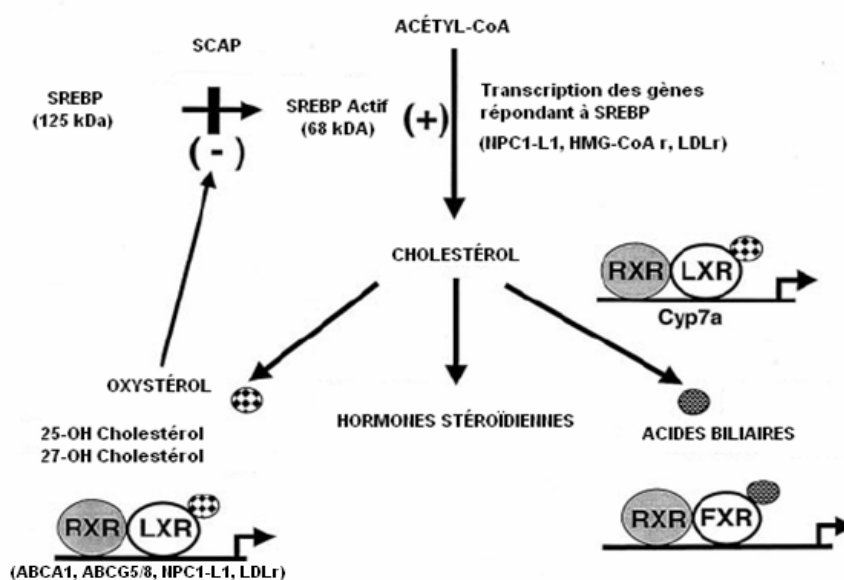
Le rôle des LXRs au niveau intestinal est bien établi, surtout en ce qui concerne la régulation des ATP-Cassettes. Un surplus de cholestérol est associé à une augmentation des oxystérols. Ces derniers vont lier le complexe LXR/RXR qui va permettre la transcription de ABCA1 et ABCG5/8.¹¹²⁻¹¹⁴ En fait, une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol a été observée chez des souris traitées avec un agoniste des LxRs.¹¹⁴ Cette diminution de l'absorption intestinale peut aussi être attribuable à une diminution de NPC1-L1. C'est du moins ce que révèle une étude effectuée par Duval et ses collègues, qui a montré que les niveaux d'ARNm de NPC1-L1 sont diminués dans le duodénum de souris traitées avec un agoniste des LXRs.¹¹⁵ Au niveau intestinal et des tissus périphériques, les études s'entendent, du moins jusqu'à maintenant, pour dire que les deux membres de famille des LXRs exercent des rôles semblables. Les recherches réalisées au niveau hépatique semblent cependant souligner l'impact distinct de LXR α et de LXR β .

Les souris déficientes en LXR α (LXR $\alpha^{-/-}$) placées sous diète riche en cholestérol, perdent la capacité de réguler le catabolisme du cholestérol alimentaire, ce qui se traduit par une accumulation de cholestérol au niveau hépatique et une augmentation importante du cholestérol plasmatique.¹¹⁶ Les auteurs de cette étude expliquent que l'augmentation tissulaire et sérique du cholestérol est principalement attribuable à l'absence de transcription de la 7 α -hydroxylase, empêchant ainsi l'excrétion du cholestérol dans la bile, chez les souris LXR $\alpha^{-/-}$. D'un autre côté, les souris LXR $\beta^{-/-}$ maintiennent leur résistance au cholestérol alimentaire et ne montrent aucune anomalie majeure dans l'accumulation de cholestérol au niveau hépatique et plasmatique. A cet effet, l'expression génique de la 7 α -hydroxylase est comparable aux animaux

contrôles suggérant ainsi un métabolisme normal des acides biliaires.¹¹⁷ Le LXR α contrairement au LXR β semble donc essentiel à la régulation hépatique des protéines impliquées dans l'excrétion biliaire du cholestérol. De plus, le LXR α serait également responsable de la transcription du LDLr en se liant directement à une séquence spécifique LXRE située sur le promoteur du gène.¹¹⁸ L'activation de ce récepteur nucléaire semble pouvoir affecter les concentrations de cholestérol sanguin, ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des maladies cardiovasculaires.¹¹⁸

Les deux isoformes de LXRs activés semblent exercer une influence comparable en ce qui concerne la régulation du transporteur ABCA1, puisqu'un agoniste des LXRs induit la transcription de ce gène chez des souris déficientes en LXR α , au niveau du foie, de l'intestin et des macrophages. L'isoforme LXR α semble, néanmoins, favoriser la régulation des gènes contrôlant l'homéostasie du cholestérol et la lipogenèse.¹¹⁹

Figure 10 : Interaction entre SREBP et LXR dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol

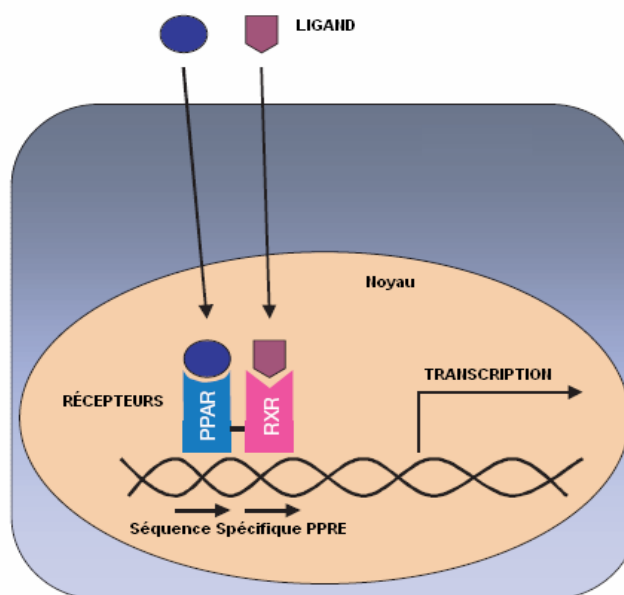


(Adapté de Edwards et al. 2000)

1.2.3.3 Les «Peroxisome Proliferator-activated Receptor» PPARs

La famille des récepteurs nucléaires stimulés par les proliférateurs des peroxisomes PPARs appartient à la superfamille des récepteurs de stéroïdes. Ils sont également décrits comme étant des récepteurs orphelins, puisque lors de leur découverte dans les années 1990, aucun ligand spécifique n'était identifié.¹²⁰ Il existe trois sous-types de récepteurs PPARs, soit PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ qui comprend deux isoformes, tous codés par un gène différent.^{120, 121} Ces facteurs de transcription régulent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et lipoprotéines, la balance énergétique, la différenciation cellulaire et la tumogénèse.⁷⁶ Ces facteurs forment un hétérodimère, avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR), qui une fois activés par la fixation de leur ligand (physiologique ou synthétique), va se lier à une séquence d'ADN spécifique située sur le promoteur des gènes cibles (voir figure 11). Cette séquence d'ADN spécifique est nommée « peroxisome proliferator response element » (PPRE) et consiste en deux séquences répétées de AGGTCA, espacées d'un nucléotide.¹²² Il est important de préciser que le complexe PPAR/RXR peut être activé par le ligand d'un des deux récepteurs, mais qu'une liaison simultanée des deux substrats rend l'activation plus efficace.¹²³

Figure 11 : Liaison du complexe PPAR/RXR sur la séquence d'ADN spécifiques PPRE



(Adapté de Kersten et al. 2000)

1.2.3.3.1 PPAR α

Le facteur de transcription PPAR α est principalement exprimé dans les tissus actifs au point de vue métabolique, tels que le foie, le cœur, le tubule proximal du rein, le tissu adipeux brun et la muqueuse intestinale.¹²¹ Ses ligands naturels sont les acides gras polyinsaturés et les leucotriènes.¹²⁰ En plus d'améliorer l'oxydation des acides gras, de diminuer les concentrations de triacylglycérols plasmatiques et de favoriser le transport inverse du cholestérol, les traitements avec des agonistes de PPAR α , semblent aussi entraîner une baisse de l'absorption intestinale du cholestérol.¹²⁴ En effet, une étude réalisée sur des souris traitées avec des fibrates (des agonistes synthétiques de PPAR α reconnus pour promouvoir la protection contre l'athérosclérose) a montré une diminution de 35% à 47% du cholestérol absorbé, correspondant à une diminution de l'expression génique de NPC1-L1 de 38% à 66%.¹²⁴ Cette diminution de NPC1-L1 causée par les fibrates est PPAR α -dépendante

puisqu'elle ne s'est pas produite chez des souris déficientes en PPAR α . En plus de diminuer l'absorption intestinale du cholestérol, les fibrates peuvent également exercer leur rôle antiathérogène en favorisant la hausse des HDL plasmatiques.¹²⁵ En fait, PPAR α favoriserait la transcription des apo A-I et A-II, de la LPL, de l'ABCA1 et de SR-B1.^{98, 126-129} De plus, l'activation de ce récepteur diminue également l'expression génique de HMG-CoA réductase et du LDL récepteur en réduisant l'abondance de SREBP-2 au noyau.¹³⁰

1.2.3.3.2 PPAR β/δ

La protéine PPAR β/δ est exprimée de façon ubiquitaire, mais plus particulièrement dans les tissus impliqués dans le métabolisme des lipides, tels que le foie, l'intestin, les reins, les tissus adipeux et le muscle squelettique.¹³¹ Elle peut parfois être exprimé à des niveaux plus élevés que PPAR α et PPAR γ .¹³¹ Ses ligands physiologiques sont, entre autres, les acides gras à longues chaînes et les prostaglandines.¹³² PPAR δ serait impliquée dans l'oxydation des acides gras au niveau musculaire et dans la différenciation cellulaire adipocytaire.¹²⁰ De plus, tout comme les PPAR α , l'activation de cette protéine jouerait également un rôle dans l'augmentation des HDLs plasmatiques en augmentant l'expression génique du transporteur ABCA1.¹³³ À la lueur de ces résultats, une équipe de recherche américaine s'est penchée sur le rôle de PPAR δ dans l'absorption intestinale du cholestérol. Les auteurs ont remarqué que l'activation de PPAR δ entraînait une augmentation de la perte fécale de cholestérol sans changer l'expression de HMG-CoA réductase et des ATP-cassette, ABCG5 et ABCG8.¹³² Ils ont toutefois remarqué une réduction de 43% de l'absorption intestinale du cholestérol, coïncidant avec une diminution significative de l'expression de NPC1-L1 intestinale.¹³² Tout comme PPAR α , l'activation de PPAR δ est associée à une augmentation des HDLs plasmatiques et une réduction de l'absorption intestinale du cholestérol.

1.2.3.3.3 PPAR γ

L'expression de PPAR γ est principalement restreinte aux tissus adipeux, au gros intestin, aux cellules placentaires et au niveau des cellules impliquées dans la réponse immunitaire et faiblement au niveau du foie.¹³⁴ Ce récepteur nucléaire serait, entre autres, associé à la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes, la mise en réserve des acides gras, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline et l'inflammation.¹²⁰ Les ligands physiologiques des PPAR γ sont les acides gras polyinsaturés, tels que l'oléate, le linoléate, l'acide eicosapentaénoïque et arachidonique et un prostanoïde, tandis que les thiazolidinediones, des antidiabétiques, sont les activateurs synthétiques de PPAR γ . Le récepteur PPAR γ existe sous deux isoformes, PPAR γ 1 et PPAR γ 2 qui possède 28 acides aminés de plus dans la région NH₂-terminale et est principalement exprimé dans les adipocytes.¹³⁴

Les agonistes synthétiques de PPAR γ sont prescrits aux patients diabétiques grâce à leur capacité à diminuer les taux de glucose et de triacylglycérols sanguins.¹³⁵ Alors, bien que le récepteur PPAR γ soit principalement connu pour son rôle dans l'augmentation de la sensibilité à l'insuline, les taux de cholestérol sanguin et le bilan des lipoprotéines peuvent également être affectés par l'activation de ce gène. Récemment, deux études cliniques impliquant le rosiglitazone et le pioglitazone, effectuées auprès de patients diabétiques, ont montré que ces traitements provoquent une augmentation des HDL plasmatiques.^{136, 137} Le traitement avec des agonistes de PPAR γ est également associé à une augmentation de la grosseur des LDLs, ce qui les rend moins athérogènes.¹³⁸ Des expériences ultérieures pour comprendre les mécanismes responsables de cette augmentation des HDLs doivent cependant être réalisées. De plus, tout comme PPAR α , l'action de PPAR γ est associée à une diminution hépatique et intestinale de la synthèse et de la capture du cholestérol. Des expériences effectuées sur des cellules Caco-2 et HepG2 ont montré une diminution de l'expression génique de HMG-

CoA réductase et du LDL récepteur lorsque les cellules sont incubées avec du troglitazone, un agoniste synthétique de PPAR γ . Cette régulation serait également causée par une diminution de la concentration nucléaire du facteur SREBP-2.¹³⁹

Les récepteurs PPARs jouent des rôles majeurs dans la régulation du métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines en gouvernant une panoplie de gènes impliquée dans le transport, le remodelage, la clairance et la synthèse des lipoprotéines. Ils sont par le fait même des cibles de choix dans le traitement des maladies cardiovasculaires

Les facteurs de transcription peuvent réguler un gène en se liant directement sur une séquence d'ADN spécifique, telle que les SREs, LXREs et PPREs, mais ils peuvent également réguler un gène indirectement en interagissant avec un autre facteur de transcription. De plus, différents récepteurs nucléaires peuvent également initier la transcription d'un même gène ou avoir la même fonction (voir Tableau 1), ce qui rend encore plus complexe la compréhension de ces mécanismes régulateurs. Des études doivent donc encore être réalisées en situations physiologiques normales qui permettront par la suite de clarifier les dérèglements qui se produisent en situation physiopathologique.

Tableau 1: Distribution et fonctions des facteurs de transcriptions impliqués dans le métabolisme du cholestérol

Facteurs de transcription	Gène (Localisation)	PM (kDa)	Expression tissulaire	Fonctions
SREBP-2	22q13	125 (Forme active 58)	Ubiquitaire	Active les gènes responsable de la synthèse et de la capture du cholestérol ¹⁰⁶
LXR α	11p11.2	44	Foie, intestin, tissus adipeux, reins et glandes adrénales	Régule l'efflux cellulaire du cholestérol ¹¹⁴ et l'excrétion du cholestérol dans la bile ¹¹⁶
LXR β	19q13.3	51	Ubiquitaire	Responsable de l'efflux cellulaire du cholesterol ¹¹⁴
PPAR α	22q13.31	53	Foie, cœur, reins, tissus adipeux, intestin et macrophage	Favorise l'oxydation des acides gras et le transport inverse du cholestérol ¹²⁵
PPAR δ	6p21.2-p21.1	50	Ubiquitaire	Participe à l'oxydation des acides gras et à la différenciation cellulaire ¹²⁰
PPAR γ	3p25	58	Tissus adipeux, gros intestin placenta, foie et macrophage	Améliore la sensibilité à l'insuline et entraîne une augmentation des HDLs circulants ¹³⁵

1.3 RÉSISTANCE À L'INSULINE ET DIABÈTE DE TYPE 2 ASSOCIÉS À L'OBÉSITÉ

Comme il a été mentionné auparavant, l'obésité est un désordre métabolique qui a la capacité d'engendrer la résistance à l'insuline, une composante critique dans l'étiologie du DT2.¹

1.3.1 La résistance à l'insuline

L'insulino-résistance se traduit par une diminution de l'effet biologique de l'insuline. Cette diminution peut être entraînée par divers désordres métaboliques, dont l'obésité, puisque cette dernière est associée à une élévation plasmatique des acides gras libres. En effet, l'augmentation de la masse adipeuse peut engendrer un flux d'acides gras libres vers les tissus tels que le foie, le muscle et le pancréas. Or, une accumulation de triacylglycérols dans ces tissus pourrait jouer un rôle dans la genèse de la résistance à l'insuline.¹⁴⁰ Ce phénomène est appelé la lipotoxicité. De plus, lorsqu'il y a une obésité, le tissu adipeux est hypertrophié et la concentration des adipocytokines, qui sont sécrétés par les adipocytes, peut être altérée.¹⁴¹ Ces cytokines participent probablement au dialogue complexe entre les organes et leurs altérations peuvent amplifier les effets de la résistance à l'insuline.^{141, 142}

Chez un sujet sain, les taux de glucose sanguin ne varient qu'étroitement, quelle que soit la condition. Le maintien de l'homéostasie du glucose résulte d'un équilibre entre le glucose absorbé par l'intestin, sa production et sa consommation par les tissus périphériques. Après l'ingestion d'un repas, les cellules β pancréatiques vont sécréter de l'insuline en réponse à l'augmentation de glucose sanguin. L'insuline va alors stimuler la captation du glucose par les tissus périphériques tels que le muscle, le tissu adipeux et le foie et freiner la production hépatique de glucose. Ces actions vont donc permettre de rétablir la glycémie.

Cependant, lorsqu'il y a une résistance à l'insuline, on constate une réduction de la sensibilité à l'insuline, ce qui est compensé par une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques β .¹⁴³ Cette hyperinsulinémie compensatoire persistera jusqu'au moment où les cellules β ne seront plus capables de sécréter suffisamment d'insuline pour normaliser la glycémie, ce qui mène à la progression du syndrome diabétique.¹⁴³

1.3.2 Le diabète de type 2

Contrairement au diabète de type 1, une maladie auto-immune caractérisée par la perte des cellules productrices d'insuline (cellules β du pancréas), et se développant le plus souvent pendant l'enfance et l'adolescence, le DT2 apparaît généralement plus tardivement à l'âge adulte. Malheureusement, depuis quelques années, on constate que cette forme de diabète frappe de plus en plus les jeunes adultes et même les enfants.¹⁴⁴

Il existe une très forte association entre le DT2 (dont 90% des diabétiques sont atteints) et l'obésité. En fait, plus que 80% des personnes souffrant de DT2 sont obèses, ce qui s'explique bien sûr par le fait que l'obésité peut engendrer la résistance à l'insuline.¹⁴⁴ On peut décrire schématiquement la succession d'évènements qui conduisent au DT2 de la façon suivante : la résistance à l'insuline entraîne une hyperinsulinémie compensatoire, suivi d'un déclin progressif de la sécrétion d'insuline qui peut s'étendre sur des années, provoquant l'hyperglycémie chronique, une caractéristique du diabète.¹⁴⁵

Le DT2 est un désordre métabolique polygénique qui résulte d'une interaction complexe entre les prédispositions génétiques et les facteurs environnementaux tels que l'alimentation, l'exercice physique et le vieillissement.¹⁴⁵ Cette maladie est définie par une hyperinsulinémie et une hyperglycémie chroniques. Dans les stades plus précoces, une saine

alimentation, de bonnes habitudes de vie et des antidiabétiques oraux peuvent souvent suffire à contrôler la pathologie.¹⁴⁵ Par contre, dans les stades plus avancés l'insulinothérapie peut s'avérer essentielle.

Il est important de noter que ce sont les complications micro- et macro-vasculaires qui font toute la gravité du diabète. En effet, les complications vasculaires telles que l'athérosclérose et l'hypertension sont les premières causes de mortalité associées au diabète. Avec la prévalence toujours en croissance du DT2, il devient primordial de contrôler ces complications vasculaires afin de diminuer la mortalité et d'améliorer le bien-être et la santé de ces patients.¹⁴⁶

L'obésité et la résistance à l'insuline, qui accompagnent souvent le DT2, travaillent de concert pour interrompre le métabolisme normal des lipoprotéines. La perte d'homéostasie et le transport anormal du cholestérol retrouvé dans la physiopathologie du diabète incitent également un au développement des maladies cardiovasculaires.

1.4 TRANSPORT DU CHOLESTÉROL DANS LA RÉSISTANCE À L'INSULINE ET LE DIABÈTE DE TYPE 2

Les patients atteints du DT2 ont un profil lipidique plus athérogène que les individus non-diabétiques, ce qui augmente leurs risques de développer des maladies cardiovasculaires. Ces dyslipidémies sont caractérisées par une diminution de la concentration des HDL-C, une élévation importante des triacylglycérols et une augmentation des LDL-C petits et denses.¹⁴⁷ Les LDLs petits et denses ont un potentiel athérogène plus grand que les LDLs de plus grande taille, puisqu'ils sont plus sensibles à l'oxydation et à la glycolysation, augmentant ainsi leur séjour dans la circulation.¹⁴⁷ En plus du métabolisme des lipoprotéines qui est altéré, le diabète est également associé à des changements dans le métabolisme du cholestérol, incluant une augmentation

du cholestérol plasmatique, de la conversion du cholestérol en sels biliaires et de l'absorption intestinale du cholestérol.¹⁴⁸

1.4.1 Les transporteurs intestinaux et hépatiques du cholestérol dans la résistance à l'insuline et le DT2

L'hypercholestérolémie associée au DT2 est donc bien reconnue. La relation entre les gènes affectant le transport hépatique et intestinal du cholestérol reste malgré tout peu décrite dans la littérature. Plusieurs études ont pourtant montré que l'absorption intestinale du cholestérol est augmentée, tout comme la capture hépatique du cholestérol chez les patients atteints de DT2. Qu'en est-il alors des transporteurs intestinaux et hépatiques du cholestérol lors de la résistance à l'insuline et plus particulièrement du DT2 ?

1.4.1.1 SR-B1

Le transporteur du cholestérol SR-B1 est surtout reconnu pour sa capacité à extraire sélectivement le cholestérol des lipoprotéines, (principalement des HDLs) au niveau du foie.⁴⁴ Comme déjà mentionné, des études réalisées récemment ont également montré qu'il facilitait l'absorption intestinale du cholestérol au niveau de la bordure en brosse.³¹ Cependant, c'est principalement son rôle au niveau hépatique qui continue à attirer l'attention dans la physiopathologie du diabète.

Les résultats obtenus grâce à l'administration de la streptozotocine qui détruit les cellules β du pancréas fournissent des pistes intéressantes dans l'étude du diabète de type 1 et 2.¹⁴⁸ Effectivement, une étude réalisée chez des rats traités avec cet agent chimique, a révélé que le récepteur éboueur SR-B1 voit son expression génique légèrement augmentée, tandis que l'augmentation de son expression protéique est très marquée, au niveau du foie des animaux diabétiques.¹⁴⁸ Une élévation hépatique de ce récepteur a également été observée chez des rates souffrant d'un syndrome métabolique induit par la

diète.¹⁴⁹ Les auteurs expliquent que cette augmentation constitue peut-être une réponse à l'élévation hépatique des lipides oxydés, puisque SR-B1 a aussi la capacité de lier ces molécules.¹⁴⁹ L'augmentation hépatique de SR-B1 entraîne aussi une réduction des HDLs circulants, ce qui représente un facteur de risque aggravant le développement des maladies cardiovasculaires.¹⁴⁹ Le récepteur SR-B1 hépatique pourrait donc être une cible thérapeutique intéressante pour favoriser une augmentation des HDLs plasmatiques et améliorer le bilan lipidique des patients diabétiques.

1.4.1.2 FAT/CD36

Une élévation des acides gras plasmatiques, induite par une diète riche en lipides, favorise leur captation par le foie et le muscle, ce qui peut causer une résistance à l'insuline puis mener ultimement au développement du DT2. Le récepteur éboueur CD36, est reconnu pour son implication dans le métabolisme des acides gras au niveau du muscle squelettique et des macrophages et c'est principalement pour cette raison qu'il fait l'objet d'étude dans la physiopathologie du DT2.¹⁵⁰

Des études réalisées sur des monocytes et des tissus musculaires de patients diabétiques ont montré que l'hyperglycémie est associée à une accumulation des triacylglycérols au niveau de ces tissus causée par une élévation du transport des acides gras attribuable à une hausse de l'expression de CD36.^{150, 151} Une équipe a également documenté l'élévation de l'expression protéique de CD36 au niveau hépatique de souris soumise à une diète riche en lipides.¹⁵² Les auteurs de cette étude ont par ailleurs constaté qu'une surexpression protéique de CD36 au niveau du foie semble jouer un rôle causal, dans le développement de l'hyperlipidémie précoce souvent associée à la pathogenèse du DT2.¹⁵² Très peu d'études ont été réalisées en ce qui a trait à l'expression de CD36 au niveau intestinal dans la physiopathologie du diabète.

1.4.1.3 NPC1-L1

Le transporteur NPC1-L1 est un intervenant majeur dans l'absorption intestinale du cholestérol. Même si de plus en plus d'études s'intéressent à son implication dans le transport hépatique du cholestérol, l'emphasis n'a pas été placée sur la physiopathologie du diabète.^{3, 153}

Une étude menée chez des patients atteints du DT2 a montré que l'expression génique de NPC1-L1 intestinale est significativement plus élevée chez les diabétiques comparativement aux patients contrôles.³ Ce qui suggère une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol chez les patients diabétiques. Paradoxalement, jusqu'à maintenant les études réalisées sur les animaux et les patients diabétiques, n'ont pas montré une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire.^{154, 155} Les auteurs de l'étude, proposent alors que l'augmentation de NPC1-L1 au niveau de l'intestin des patients diabétiques faciliterait l'absorption du cholestérol biliaire et possiblement de celui nouvellement synthétisé, plutôt que l'absorption du cholestérol alimentaire.³ Cette hausse de NPC1-L1 observée au niveau intestinal des patients diabétiques a aussi été confirmée chez des « Zucker diabetic fatty rat ». Une augmentation de l'expression hépatique du transporteur a également été observée chez ces animaux.¹⁵⁶ En outre, une forte corrélation positive a été observée entre les taux d'ARNm de NPC1-L1 et la sécrétion des lipoprotéines, soit des chylomicrons au niveau de l'intestin et des VLDLs au niveau hépatique.¹⁵⁶

1.4.1.4 ANAX2/CAV-1

En ce qui concerne le rôle d'ANAX2 et de la CAV-1 dans le diabète peu ou pas d'études ont été effectuées. Certains travaux réalisés jusqu'à maintenant ont toutefois montré que la protéine ANAX2 était potentiellement impliquée dans l'absorption intestinale du cholestérol.^{61, 62} Même si les débats

persistent sur sa fonction exacte, l'ensemble des chercheurs s'entendent pour dire qu'elle contribue au transport intracellulaire du cholestérol.^{61, 62} Des études ont déjà montré qu'elle est associée, ou du moins qu'elle est altérée dans la maladie de Niemann-Pick type C.^{61, 62} Il serait donc intéressant d'étudier le statut de cette protéine dans le DT2 associé à l'hypercholestérolémie.

1.4.1.5 Le LDLr et PCSK9

La concentration des LDLs plasmatiques est dépendante de l'équilibre entre la synthèse et le catabolisme des LDLs. Une des principales voies de la clairance du cholestérol par le foie est effectuée par l'action du LDLr qui capte les LDLs riches en cholestérol. La physiopathologie du DT2 est parfois associée à une diminution de la clairance des LDLs circulants qui pourrait être attribuable à une diminution hépatique du LDLr.¹⁴⁹

En effet, des expériences menées sur des rates résistantes à l'insuline ont révélé des taux protéiques de LDLr significativement plus bas au niveau du foie des animaux résistants.¹⁴⁹ Une étude effectuée sur des rats traités à la streptozotocine a également montré une diminution de l'expression génique du récepteur des LDLs associé à une augmentation des LDLs circulants. Cette réduction de l'ARNm n'est cependant pas associée à une baisse de l'expression protéique. Les auteurs ont alors proposé alors que la fonction du LDLr serait altérée dans le diabète, ce qui expliquerait l'augmentation de la concentration des LDLs plasmatique.¹⁵⁷ Cette diminution du LDLr hépatique associée à la clairance des LDLs n'est pas inhabituelle et pourtant il est fréquent de voir des études réalisées sur des modèles de diabète, qui n'ont aucune différence dans les taux de LDLs plasmatiques.¹⁵⁸ En effet, il semblerait que la physiopathologie du diabète soit davantage associée à des petits LDLs denses qu'à une augmentation du taux de LDLs sanguins.¹⁵⁸ Or, l'augmentation des LDLs petits et denses retrouvés dans le diabète est un

facteur de risque associé aux maladies cardiovasculaires aussi important qu'une clairance des LDLs amoindrie.

Au niveau de l'intestin, une étude effectuée chez des rats traités à la streptozotocine a montré une élévation de l'expression génique du récepteur des LDLs des animaux diabétiques.¹⁵⁹ Cependant, puisque le rôle de l'intestin dans la clairance des LDLs est plutôt faible, on se demande si l'augmentation de l'expression du LDLr intestinal améliorerait l'hypercholestérolémie associée au diabète.¹⁵⁹

Peu d'études ont été effectuées sur le statut de la PCSK9 lors du diabète. Des travaux menés sur des rats diabétiques ont cependant montré une diminution importante de la forme mature de la protéine au niveau hépatique.¹⁵⁷ Des études supplémentaires doivent encore être effectuées pour comprendre son implication au niveau hépatique et intestinal dans cette physiopathologie.¹⁵⁷

1.4.1.6 ABCA1

Le transporteur ABCA1 contribue à la formation des HDLs en permettant au cholestérol de se lier à l'apoA-I. Il est maintenant reconnu que le DT2 est souvent associé à une diminution des HDLs plasmatiques, ce qui semble favoriser le développement des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose.¹⁴⁸ Cette diminution des HDLs circulants est attribuable à une diminution de l'ABCA1 au niveau du foie et dans une moindre mesure de l'intestin.

Effectivement, une diminution importante de l'expression génique de ABCA1 a été observée au niveau hépatique et intestinal des rats diabétiques (streptozotocine).¹⁴⁸ Puisque aucun changement n'a été noté dans l'expression de LXR α , les auteurs stipulent que la régulation à la baisse de l'ABCA1 est

probablement causée par l'accumulation d'acétoacétate. Ces observations concordent avec celles d'une autre équipe qui a également noté une diminution substantielle de l'expression protéique de ABCA1 hépatique chez des souris devenues diabétiques, sans toutefois observer de changement dans l'expression des récepteurs nucléaires LXRs.¹⁶⁰ Les mécanismes sous-jacents demeurent cependant sujets à des études ultérieures.¹⁶⁰ Par ailleurs, une diminution significative de l'expression génique de l'ABCA1, associée à une forte tendance à la baisse de LXR α , a également été observée chez des patients atteints du DT2.¹⁶¹

1.4.1.7 ABCG5 et ABCG8

Les transporteurs ABCG5 et ABCG8 travaillent en tandem pour excréter le cholestérol et les stérols végétaux dans la lumière intestinale et dans la bile au niveau hépatique. Quelques études réalisées sur des rats, dont le diabète a été induit grâce à la streptozotocine, ont montré une réduction de l'expression des transporteurs du cholestérol ABCs au niveau hépatique et intestinal de ces animaux.^{148, 162} Par ailleurs, cette réduction de l'ARNm des transporteurs ABCG5 et ABCG8 au niveau du foie est fortement associée à une hyposécrétion du cholestérol hépatobiliaire.¹⁴⁸ Il est toutefois important de mentionner qu'aucune différence hépatique de l'expression du gène de LXR α , pourtant reconnu pour contrôler l'expression de ces transporteurs, n'a été observée chez les animaux traités à la streptozotocine.¹⁴⁸

Au niveau du jéjunum, il y a aussi une diminution de l'expression génique de ces transporteurs qui est associée à une hausse de l'absorption intestinale du cholestérol.¹⁴⁸ Ces résultats ont été confirmés sur des rats traités à la streptozotocine¹⁵³, et chez des patients atteints du DT2, par Lally et ses collègues, qui ont observé une diminution intestinale des ATP-cassettes ABCG5 et ABCG8 chez les sujets diabétiques.³ Les auteurs suggèrent que l'augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol observée dans le DT2

est associée à la fois à une diminution de l'excrétion du cholestérol par ces transporteurs et à l'augmentation de l'expression de NPC1-L1 au niveau de l'intestin.¹⁵³

La corrélation négative entre les taux d'ARNm des transporteurs ABCG5/ABCG8 et de NPC1-L1 suggère qu'il existe un mécanisme de coordination dans la régulation de ces protéines. Lorsqu'un besoin en cholestérol se fait sentir, l'absorption intestinale augmente via une hausse de l'expression de NPC1-L1 et une diminution de l'expression de ABCG5/8. Dans le DT2, cette synergie entre les transporteurs augmente la quantité de cholestérol dans les chylomicrons au niveau intestinal et dans les VLDLs au niveau hépatique.¹⁵³ De plus, la diminution de l'expression du transporteur ABCA1 et l'augmentation de SR-B1 hépatique entraînent une diminution des HDLs plasmatiques, qui contribue également à élever le cholestérol dans les lipoprotéines à plus fort potentiel athérogène telles que les VLDLs et LDLs petits et denses.

1.4.2 Enzymes impliquées dans le transport du cholestérol dans la résistance à l'insuline et le diabète de type 2

Outre les transporteurs intestinaux et hépatiques, les enzymes responsables de la synthèse et de l'estérification du cholestérol pourraient également être altérées lors de la résistance à l'insuline et du DT2.

1.4.2.1 HMG-CoA réductase

Le diabète est souvent associé à une augmentation de la synthèse du cholestérol.¹⁶³ Puisque la protéine HMG-CoA réductase est l'enzyme limitante de la synthèse *de novo* du cholestérol, il est normal que plusieurs études se soient attardées sur son expression au niveau hépatique et intestinal.

En effet, une étude réalisée sur des « Zucker diabetics fatty rats », qui développent un diabète à cause d'une mutation récessive autosomale du récepteur de la leptine, a montré une augmentation significative de l'expression génique de la HMG-CoA réductase intestinale comparativement aux rats contrôles.¹⁵⁶ Une augmentation de l'activité enzymatique de la HMG-CoA réductase a également été observée au niveau intestinal de rats et de chiens dont le diabète a été induit chimiquement à l'aide de la streptozotocine.¹⁵⁹ De plus, une étude effectuée sur des lapins dont le diabète a été induit par l'alimentation montre que l'activité intestinale de la HMG-CoA réductase est également augmentée, tandis que l'activité hépatique est significativement diminuée chez les animaux diabétiques.¹⁶⁴ Ces résultats au niveau hépatique ont par ailleurs été observé par notre laboratoire chez le *Psammomys Obesus*, le modèle utilisé dans le cadre de ce projet¹⁶⁵, mais également chez un modèle de rat dont le diabète a été induit par un agent chimique.¹⁶⁶

Pour ce qui est de l'activité de la HMG-CoA réductase dans le diabète, il semble donc y avoir une dichotomie entre les résultats obtenus au niveau intestinal et au niveau hépatique. Même si les deux organes ont des rôles distincts, des études supplémentaires sont nécessaires pour valider les résultats et pour comprendre l'antagonisme enregistré dans l'activité de HMG-CoA réductase.

1.4.2.2 ACAT-2

L'ACAT-2 est une protéine liée au réticulum endoplasmique rugueux, responsable de l'estérification intracellulaire du cholestérol, principalement exprimée au niveau intestinal et hépatique. L'activité normale de cette enzyme prévient potentiellement une accumulation toxique du cholestérol libre dans les membranes cellulaires. En plus de jouer un rôle dans la modulation de la concentration du cholestérol libre intracellulaire, elle régule la voie de signalisation du cholestérol cellulaire.⁸⁹

La résistance à l'insuline chez des rates est accompagnée d'une augmentation de l'expression protéique de l'ACAT-2 au niveau du foie.¹⁴⁹ Cette hausse de la masse protéique de l'ACAT-2 hépatique contribue à l'élévation des VLDLs, et par le fait même des LDLs plasmatiques observés dans ce désordre métabolique.¹⁴⁹ De plus, les auteurs de l'étude mentionnent que cette augmentation de l'expression de l'ACAT-2 peut aussi contribuer à la réduction de la synthèse biliaire et, donc, favoriser l'hypercholestérolémie associée à la résistance à l'insuline.¹⁴⁹ Une augmentation de l'activité hépatique de l'ACAT a également été observée chez les *Psammomys Obesus* diabétiques.¹⁶⁵

Au niveau intestinal, des résultats similaires ont été retrouvés chez des rats diabétiques traités à la streptozotocine, soumis à une diète riche en lipides.^{167, 168} En effet, une augmentation significative de l'activité de l'ACAT intestinale a été observée au niveau intestinal des rats diabétiques comparativement aux animaux contrôles. Toutefois, ces études réalisées chez les rats ne font pas la distinction entre les deux isoformes de l'ACAT. Des travaux menés beaucoup plus récemment, à l'aide d'anticorps bloquant des l'ACAT-1 et de l'ACAT-2, ont par contre montré que l'élévation de l'activité de l'ACAT dans le diabète est principalement attribuable à l'isoforme ACAT-2.⁹¹

L'hypercholestérolémie retrouvée chez les diabétiques semble entre autres attribuable à une altération, variable selon le tissu, de la biosynthèse du cholestérol via l'enzyme HMG-CoA réductase et de l'activité enzymatique de l'ACAT-2.

1.4.3 Facteurs de transcription impliqués dans la régulation du transport du cholestérol dans la résistance à l'insuline et le diabète de type 2

Les facteurs de transcription régulent divers gènes qui permettent de maintenir l'homéostasie de différentes voies métaboliques telles que la biosynthèse et la capture hépatique du cholestérol via SREBP2, le transport

inverse et le catabolisme du cholestérol par l'intermédiaire des LXRs, le métabolisme des acides gras, du glucose et des triacylglycérols et des lipoprotéines par l'activation des PPARs. Une altération de ces récepteurs peut entraîner un dérèglement de ces voies et causer plusieurs troubles métaboliques dont le DT2.

1.4.3.1 SREBPs

La famille de facteurs de transcription SREBPs, qui comprend SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2, régule plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Plusieurs études ont été effectuées sur SREBP-1c dans le diabète puisqu'il est lui-même régulé par l'insuline, le glucose et les acides gras dans plusieurs tissus tels que le foie et le tissu adipeux.¹⁶⁹ Les facteurs de transcription SREBPs, plus spécifiquement SREBP-1c, semblent donc associés au dérèglement génique et aux complications (stéatose hépatique) retrouvés dans la physiologie du diabète.¹⁶⁹

1.4.3.1.1 SREBP-2

Le facteur de transcription SREBP-2 est crucial dans la régulation du métabolisme du cholestérol. En effet, il joue un rôle important dans la concentration du cholestérol plasmatique, en se liant préférentiellement aux promoteurs des gènes impliqués dans la biosynthèse et la clairance hépatique du cholestérol, soit la HMG-CoA réductase et le LDLr, respectivement. Cependant peu d'études se sont penchées sur le statut hépatique et intestinal de SREBP-2 dans le diabète. Quelques données disponibles sur les cellules β pancréatiques proposent que la surexpression de SREBP-2 puisse causer un diabète attribuable à une accumulation de cholestérol dans les cellules (lipotoxicité).¹⁷⁰ Puisque le DT2 est souvent associé à une augmentation intestinale et une réduction hépatique de l'activité de la HMG-CoA réductase, on peut s'attendre à voir le facteur SREBP-2 aller dans ce sens.

1.4.3.2 LXRs

Les récepteurs nucléaires LXRs participent activement à la régulation du métabolisme du cholestérol, des lipides et des hydrates de carbone.^{171, 172} Les principaux tissus touchés par l'action de ces facteurs sont le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique, qui sont par le fait même, les cibles de l'insuline. Puisque le DT2 est causé par une résistance à l'insuline de ces tissus, les facteurs LXRs pourraient être des intervenants clés dans l'apparition de l'hyperglycémie et de l'hyperlipidémie associées au diabète.¹⁷²

Cependant, une étude réalisée sur des patients atteints du DT2, n'a pas montré de différences significatives entre les taux d'ARNm de LXR α/β mesurés chez les diabétiques comparativement aux individus contrôles.¹⁷³ Une seconde étude confirme ces résultats, bien qu'une forte tendance à la baisse de l'expression génique de LXR α a été observée chez les patients diabétiques.¹⁶¹ Il est important de préciser que les résultats de ces deux études ont été obtenus sur des leucocytes mononucléaires, qui semblent avoir un mécanisme de régulation similaire aux hépatocytes.¹⁷⁴ En ce qui concerne l'expression ou l'activité de LXRs au niveau intestinal, très peu de travaux ont été effectués sur le sujet. Il est donc intéressant d'étudier le statut des facteurs LXR α et LXR β au niveau intestinal et hépatique dans le DT2.

1.4.3.3 PPARs

Les facteurs de transcriptions de la famille des PPARs participent au contrôle de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et lipoprotéines, dans la différenciation des adipocytes et dans le métabolisme de l'insuline.^{120, 125, 130} Les trois isoformes de cette famille, soit PPAR α , δ et γ ont une distribution distincte et par le fait même des fonctions différentes. Dans le diabète, ces trois récepteurs nucléaires sont altérés.

1.4.3.3.1 PPAR α

Le récepteur PPAR α participe à la transcription de plusieurs protéines et enzymes impliqués dans l'oxydation et la captation des acides gras.¹²⁰ Puisque le diabète est souvent associé à un dérèglement du métabolisme des acides gras, on peut s'attendre à ce que l'activité de PPAR α soit altérée.

Effectivement, deux études effectuées sur des souris traitées à la streptozotocine et des souris déficientes du récepteur de la leptine, ont montré des taux d'ARNm de PPAR α plus élevés au niveau hépatique des souris diabétiques comparativement aux animaux contrôles.^{175, 176}

1.4.3.3.2 PPAR δ

Les fonctions du récepteur nucléaire PPAR δ demeurent beaucoup moins connues que ceux de PPAR α et PPAR γ . Le PPAR δ est pourtant grandement exprimé au niveau du tractus digestif où il joue un rôle dans la différenciation et la prolifération cellulaire.¹³⁰ De plus, il a récemment été identifié comme étant en partie responsable de la régulation de l'absorption intestinale du cholestérol.¹³²

Des expériences menées précédemment ont en effet montré que l'activation du gène PPAR δ par un agoniste synthétique entraînait une baisse significative de l'expression de NPC 1-L1 intestinal.¹³² Dans le DT2, l'activation des PPARs semble rétablir à des niveaux contrôles l'expression génique de NPC1-L1 hépatique¹⁵⁶, ce qui laisse supposer que l'activation du récepteur nucléaire PPAR δ est diminuée chez les patients diabétiques. D'un autre côté, une étude menée sur des souris, n'a pas montré de différences dans l'expression génique de PPAR δ au niveau du foie des animaux diabétiques.¹⁷⁶ Des études ultérieures sont donc nécessaires afin de déterminer le statut de PPAR δ et d'éclaircir ses implications dans la physiopathologie du diabète.

1.4.3.3.3 PPAR γ

Le facteur PPAR γ , qui est fortement exprimé au niveau des tissus adipeux, a pour fonction de faciliter la mise en réserve des lipides et du glucose, de stimuler l'oxydation du glucose, de diminuer les taux d'acide gras libre circulants et ultimement d'améliorer la sensibilité à l'insuline.¹³⁵ Il n'est donc pas surprenant que des agonistes de PPAR γ soient prescrits aux patients atteints du DT2.

Par ailleurs, une étude effectuée chez des souris diabétiques déficientes du gène ou du récepteur de la leptine a montré des taux d'ARNm hépatiques de PPAR γ significativement plus élevés comparativement aux souris contrôles.¹⁷⁶ Cette augmentation de l'expression génique serait associée au développement de l'obésité.

Malgré l'importance des PPARs dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose, seuls quelques travaux se sont penchés sur l'expression et la régulation des différents isoformes des PPARs dans les modèles de l'obésité et du diabète. Plusieurs études sont par conséquent nécessaires afin d'améliorer la compréhension de l'implication de ces facteurs dans les désordres métaboliques.

2. OBJECTIFS

L'obésité, la résistance à l'insuline et le DT2 sont des désordres physiologiques interreliés, profondément associés à plusieurs troubles métaboliques et souvent précurseurs du développement des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose. Or, plusieurs études ont déjà montré que le métabolisme du cholestérol et des lipides est grandement altéré chez les patients souffrant de résistance à l'insuline et de DT2, ce qui augmente les risques de souffrir de troubles cardiovasculaires.^{2,4} Le traitement de l'hypercholestérolémie chez ces patients contribue à réduire significativement les risques de développer ces désordres et augmente considérablement l'espérance de vie de ces patients.²

Bien que de plus en plus d'études soient réalisées dans le domaine, les informations concernant le transport du cholestérol et le statut des différents gènes qui y sont impliqués, tels que les transporteurs, les enzymes et les facteurs de transcriptions demeurent peu connus dans le DT2. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait pourtant faciliter la prévention de l'hypercholestérolémie associée et même permettre de traiter plus efficacement les maladies cardiovasculaires.

L'objectif de ce travail est donc de déterminer le statut des gènes impliqués dans le transport hépatique et intestinal du cholestérol dans le DT2. Plus précisément, le but de cette étude vise à déterminer l'expression des gènes transporteurs participant à l'absorption intestinale et la capture hépatique du cholestérol, des enzymes impliquées dans la biosynthèse et l'estérification du cholestérol, ainsi que des facteurs de transcriptions capable de moduler le transport du cholestérol chez le *Psammomys obesus* qui représente un excellent modèle animal pour l'étude du DT2.

Figure 12 : Le *Psammomys Obesus*



Fig. 8 : Le *Psammomys Obesus* est une gerboise vivant dans les régions désertiques du nord de l'Afrique et de la Méditerranée. La captivité et l'exposition à une diète de laboratoire font ressortir le phénotype de DT2, comparable à celui développé chez l'humain.

En effet, contrairement aux modèles de rongeurs fréquemment utilisés dans l'étude du DT2, le développement du diabète chez le *Psammomys obesus*, est conditionnel à la valeur énergétique de son alimentation.⁵ Ce modèle cadre remarquablement bien avec les effets de l'abondance nutritionnelle retrouvée dans notre société. C'est lorsque cet animal est exposé à une diète riche en énergie qu'il développe graduellement l'obésité, la résistance à l'insuline, puis une hyperglycémie qui caractérise le DT2.¹⁷⁷ Le *Psammomys obesus* représente donc un excellent modèle permettant d'étudier le DT2 relié à l'obésité à l'instar de celui retrouvé chez l'humain.

Intestinal and hepatic cholesterol carriers in diabetic *Psammomys obesus*

Geneviève Lalonde^{1,2}, Edgard Delvin^{1,3}, Mounib Elchebly^{1,3}, Louis-Philippe
Précourt^{1,2}, Ehud Ziv⁴, and Emile Levy^{1,2}

¹*Research Centre, CHU Sainte-Justine, Department of*

²*Nutrition and*
³*Biochemistry, Université de Montréal, Québec.*

⁴*Diabetes Unit, Division of Internal Medicine, Hadassah University Hospital,
Jerusalem, Israel*

Running Title: Cholesterol transporters in type 2 diabetes

Address for correspondence:

*Dr. Emile Levy
GI-Nutrition Unit
CHU Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5
Tel.: (514) 345-7783
Fax: (514) 345-4999
E-mail: emile.levy@recherche-ste-Justine.qc.ca

ABSTRACT

Insulin resistance (IR) and type 2 diabetes (T2D) are characterized by hyperlipidemia. The aim of the present study was to elucidate whether T2D contributes to abnormal cholesterol (CHOL) homeostasis in the small intestine and liver of *Psammomys obesus*, a model of nutritionally induced IR and TD2. Diabetic animals exhibited a lower intestinal CHOL uptake, which was associated with a decrease in (i) the gene and protein expression of NPC1L1, which plays a pivotal role in CHOL incorporation in the enterocytes; and (ii) mRNA of ABCA1 that mediates CHOL efflux from intestinal cells to apolipoprotein A-I and HDL. No changes were observed in the other intestinal transporters SR-BI and annexin2 (ANXA2). On the other hand, in diabetic animals, a significant mRNA decrease was noticed in ABCG5 responsible for the secretion of absorbed CHOL back into the lumen. Furthermore, jejunal PCSk9 protein was diminished and LDLr was raised, along with a significant downregulation in jejunal HMG-CoA reductase in TD2 *Psammomys obesus*. Finally, among the transcription factors tested, only an increase in LXR α and a decrease in PPAR β/δ mRNAs were detected in the intestine. In the liver, there was (i) an augmentation in the protein mass of NPC1L1, SR-BI and ANXA2; (ii) an upregulation of SR-BI mRNA; (iii) a fall in ABCG8 protein content, as well as ABCG5 and ABCA1 mRNA; and (iii) an augmentation in LXR α and PPAR β/δ mRNA, together with a drop in SREBP-2 protein. Overall, our findings show that the development TD2 in *Psammomys obesus* modifies the whole intra-enterocyte and hepatocyte machinery responsible for cholesterol homeostasis.

Key words: Enterocyte, liver, cholesterol transport, HMG-CoA reductase, transcriptor factors, *Psammomys obesus*

ABBREVIATIONS

ABC;	ATP-binding cassette transporters
ACAT;	Acyl-Coenzyme A:cholesterol acyltransferase
ANXA2;	Annexin-2
Apo;	apolipoprotein
CHOL;	Cholesterol
CM;	Chylomicron
HDL;	High-density lipoprotein
IR;	Insulin resistance
LDLr ;	Low-density lipoprotein receptor
LXR ;	Liver X receptors
NPC1L1;	Niemann-Pick C1 like 1
PCSK9;	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PPAR;	Peroxisome proliferator-activated receptors
SR-BI;	Scavenger receptor-class B type I
SREBP-2;	Sterol regulatory element binding protein-2
TD2;	Type 2 diabetes
TG;	Triglycerides
VLDL;	Very-low density lipoprotein

INTRODUCTION

The prevalence of diabetes has risen dramatically worldwide with cardiovascular disease as the major cause of morbidity and mortality. (1-4) The current escalation in the global prevalence of obesity and insulin resistance (IR) and the increased risk for coronary artery disease explain the renewed interest in type 2 diabetes (TD2). (4-5) Both the hyperglycemia and dyslipidemia accompanying diabetes and the metabolic syndrome contribute to the enhanced atherogenesis. (3, 6, 7) Inappropriate elevation of plasma levels of triglycerides (TG) transported by hepatic very-low density lipoprotein (VLDL), constitute the central pathophysiologic feature of IR and TD2. Additionally, there is a significant contribution of the intestine to dyslipidemia in the presence of IR and TD2. (8-10) An overproduction of chylomicrons (CM) with enhanced secretion of both TG and apolipoprotein (apo) B-48 has been noted, which is consistent with frequent postprandial hyperlipidemia. (10-12) Despite significant advances, the mechanisms underlying abnormally raised CM assembly are not fully clear. In particular, efforts should be exerted to determine whether abnormalities of intestinal cholesterol (CHOL) transport can contribute to pathologic processes since a positive relationship has been established between CHOL absorption magnitude, on one hand, and plasma CHOL levels and coronary disease, on the other hand. (13-15)

In stark contrast to previous tenets, more and more investigators suggest that CHOL absorption is a protein-mediated process. In fact, growing evidence supports the concept that several proteins are involved in mediating intestinal CHOL uptake (through scavenger receptor-class B type I (SR-BI), Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1), fatty acid translocase/cluster determinant 36, aminopeptidase N, P-glycoprotein, and the caveolin-1/annexin-2 (ANXA2) heterocomplex) and export via ATP-binding cassette transporters, ABCA1 and ABCG5/ABCG8, which act as efflux pumps favoring CHOL exit out of absorptive cells into the lumen and basolateral compartment, respectively. Curiously, the status of transporters intervening in intestinal CHOL movement has not yet been ascertained in TD2. In fact, the few studies performed so far have shown conflicting data in intestinal CHOL absorption in both type 1 diabetes and TD2. (16-21) The aims of the present

study were to evaluate the effect of TD2 on (i) intestinal and hepatic CHOL transporters; (ii) the expression of genes regulating CHOL homeostasis; and (iii) transcription factors involved in the control of CHOL metabolism, in a well established animal of diabetes, the *Psammomys obesus*.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Psammomys obesus gerbils (2.5–3.5 months old) from the Hebrew University colonies were obtained from Harlan (Jerusalem, Israel). They were housed in individual polypropylene cages in a temperature-controlled room with a 12-h light-dark cycle when water and food were supplied ad libitum as described previously (10, 22-24). All experimental procedures performed in the study were authorized by the Institutional Animal Care Committee.

Intestinal organ culture and cholesterol uptake

The jejunum from *Psammomys obesus* was cleared of mesentery, split longitudinally, washed in culture medium, and cut into explants (3 x 7 mm). Five to seven explants were randomly transferred onto lens paper, with the mucosal side facing up in each organ culture dish (Falcon Plastics, Los Angeles, CA). Six dishes were used for each experimental condition. An amount of medium (0.8 ml) sufficient to dampen the lens paper was added. Explants were cultured in serum-free Leibovitz L-15 medium according to the technique described previously. (10, 22) After a 30-min stabilization period, CHOL was studied by replacing the medium with a fresh one containing 10 μ Ci [14 C]-CHOL added as a mixed bile salt micelle (6.6 mM sodium taurocholate, 1 mM oleic acid, 0.5 mM monoolein, 0.1 mM CHOL and 0.6 mM phosphatidylcholine). Intestinal explants from *Psammomys obesus* were cultured for 1 h. Tissue integrity was confirmed by morphological (lighted electron microscopy) and biochemical (sucrase activity) studies.

Western Blot

To assess the protein expression of various proteins, jejunal and hepatic tissues were homogenized in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 1.5 mM magnesium chloride, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 50 mM sodium fluoride, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/ml Aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin and 1 mM sodium orthovanadate), followed by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min. and prepared for Western blotting as

described previously. (25) The Bradford assay (Bio-Rad) was used to determine protein concentration. Proteins were denatured in sample buffer containing SDS and β -mercaptoethanol, separated on a 7.5% SDS-PAGE gel, and blotted onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites of the membranes were blocked using 5% defatted milk proteins. Reactions took place by the addition of primary antibodies directed against targeted proteins. Reaction was revealed with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and enhanced chemiluminescence reagent (PerkinElmer, MA, USA). β -actin was used as an internal control to confirm equal loading protein on SDS-PAGE. Blots were developed and proteins were quantified using a Hewlett-Packard scanner equipped with a transparency adaptor and UN-SCAN-IT (Silk Scientific Corporation) software.

RNA extraction and quantitative Real Time (RT)-PCR

Total RNA was extracted from intestinal and hepatic samples using TRIzol® Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications and reverse transcribed into cDNA using the Superscript First Strand Synthesis System (Invitrogen). The cDNA was used as template for RT-PCR analysis. Primers against the genes of interest were designed using the available mRNA sequence information in NCBI GeneBank. Basic local alignment search tool (BLAST, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) was used for primer verification. Since the genes studied were not yet sequenced for the *Psammomys obesus*, we designed primers based on the conserved regions in mRNA of the three well characterized species: *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* and *Mus musculus*. The designed primers (Table 1) were verified for their specificity by classic RT-PCR using rat tissue and human cells (Caco-2 and HepG2).

Quantitative real-time PCRs were performed using Quantitect SYBR Green kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in an ABI Prism® 7000 Sequence Detection System. The PCR reactions were carried in a 96-well plates with a final volume of 25 μ l per well. 12.5 μ l of SYBR Green Mix (2X) were added to a well containing 25 picomoles of the forward and reverse primers and 0.5 μ g of cDNA template in a total of 12.5 μ l of DEPC H₂O. Subsequently, negative controls

without cDNA were prepared. The reaction of amplification was carried out using 40 cycles. To normalize the different cDNA sample amounts, the housekeeping gene GAPDH was employed as a reference gene. The analyses were performed in triplicate for each gene and for GAPDH in the same plate. The relative mRNA fold-changes between the animal groups were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. (26)

HMG-CoA reductase activity assay

Enzymatic activity was assayed as described previously. (27, 28) The reaction mixture contained 100 mM potassium phosphate (pH 7.4), 200 µg protein, 20 mM glucose-6-phosphate, 12.5 mM dithiothreitol, 2.5 M NADP and 1.2 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase. The reaction was initiated by the addition of [14 C]-HMG-CoA (200 Bq/nmol) for 30 min at 37°C. The [14 C]-mevalonate formed was converted into lactone by the addition of 10 N HCl, isolated by TLC and counted using an internal standard to correct for incomplete recovery.

Acyl-Coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) activity assay

The activity of ACAT was determined at initial rates by adding 5 nmol of [14 C]-oleoyl-CoA (specific activity ~167 Bq/nmol) to the mixture containing 190 µg of cellular protein to initiate the reaction in a buffer solution (pH 7.5) consisting of CHOL, 0.04 M KH_2PO_4 , 50 mM NaF, 0.25 M sucrose, and 1 mM EDTA. (28) After incubation for 10 min at 37°C, the reaction was stopped by adding chloroform-methanol (2:1, v/v) followed by free CHOL (FC) and cholesteryl ester (CE) as carriers. The FC and CE formed were isolated by TLC and counted.

Analytical procedures

Plasma glucose was determined by the glucose oxidase method, and insulin levels were assessed by radioimmunoassay (Phadesph; Kabi Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Sweden). Plasma TG and CHOL levels were measured colorimetrically (Roche, Basel, Switzerland).

Data analysis

To assess differences in the parameters studied, data were statistically analysed by Student's two tailed *t*-test. A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Body weight and biochemical parameters

As expected from our previous studies (10, 24), the diabetic *Psammomys obesus* exhibited moderate weight gain and developed hyperglycemia, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia (Figure 1). Both plasma FC and CE were significantly elevated in diabetic animals.

Intestinal cholesterol uptake

To examine CHOL uptake in the small intestine of *Psammomys obesus*, jejunal explants were cultured in the presence of [¹⁴C]-CHOL. Following the incubation period, jejunal explants originating from diabetic animals displayed a lower capacity to incorporate [¹⁴C]-CHOL compared with control explants (Figure 2).

Intestinal gene and protein expression of cholesterol transporters

The decreased CHOL uptake exhibited by diabetic jejunal explants may be due to differences in the expression of CHOL transporters. To test this hypothesis, the gene and protein expression of CHOL transporters present in intestinal specimens was examined. We first assessed the proteins that transport CHOL into the enterocyte. As illustrated in Figure 3A, a significant decrease characterized the protein mass of NPC1L1, while only a trend of decline was noted in SR-BI and ANXA2 in intestinal tissue of TD2 *Psammomys obesus*. This protein profile was confirmed when the gene expression was analyzed using quantitative real-time PCR (Figure 3B). We subsequently focused on ABCG5/G8 and ABCA1 that act as efflux pumps favoring CHOL export out of absorptive cells into the lumen or basolateral compartment, respectively. Assessment by real-time PCR revealed a significant drop of ABCA1 and ABCG5 in TD2 jejunal specimens (Figure 4B).

Intestinal protein expression of PCSK9 and LDL receptor

Since proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) posttranslationally promotes the degradation of the low-density lipoprotein receptor (LDLr) (29-32), we assessed the protein expression of both proteins in order to determine their implication in intestinal CHOL homeostasis. A fall was recorded in the protein mass of PCSK9 accompanied with a rise in LDLr protein expression in the jejunal tissue of TD2 *Psammomys obesus* compared to animal controls (Figure 5A).

Intestinal regulatory enzymes of cholesterol metabolism

Next, we determined the impact of diabetes on the regulatory sterol enzymes: HMG-CoA reductase (EC 1.1.1.34), the rate-limiting step in CHOL synthesis, and ACAT (EC 2.3.1.26), an integral protein present in the rough endoplasmic reticulum that catalyzes the formation of CE from FC and fatty acyl-CoA. HMG-CoA reductase protein was found significantly decreased whereas exploration of HMG-CoA reductase mRNA and activity revealed only a slight trend of fall in jejunal tissues derived from TD2 *Psammomys obesus* (Figure 6A). As to ACAT, no significant changes were detected in the gene expression and activity in TD2 intestinal tissue (Figure 6B).

Intestinal transcription factors

To approach the mechanisms triggered by diabetic condition, we assessed the gene expression of several factors that affect the transcription of a variety of genes associated with lipid and CHOL metabolism, including liver X receptors (LXR) α , β , peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) α , β/δ , γ , and protein and gene expression of sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2). Figure 7 depicts their gene expression and shows an increase in LXR α a decrease in PPAR family members, especially PPAR β/δ , without any significant variations in SREBP-2 mRNA and protein (Figure 7).

Hepatic gene and protein expression of cholesterol transporters

An increase was evident in the protein mass of NPC1L1, SR-BI and ANXA2 assessed in the liver of TD2 *Psammomys obesus* compared to controls (Figure 8A). On the other hand, ABCG5 protein was lowered (Figure 9A). Quantitative RT-PCR analysis showed a significant rise in SR-BI mRNA and a trend of decrease and increase in the gene expression of NPC1L1 and ANXA2, respectively, in TD2 animals (Figure 8B). A marked lessening was noticed in ABCG8 and ABCA1 mRNA in diabetes condition (Figure 9B).

Hepatic protein expression of PCSK9 and LDLr

Since the liver is the principal organ for LDL clearance, we have evaluated the expression LDLr and PCSK9. Only a trend of decrease and increase was noticed in the protein mass of PCSK9 and LDLr respectively, in TD2 *Psammomys obesus* in comparison to controls (Figure 10A). Under our experimental conditions, mRNA of PCSK9 and LDLr remained unchanged (Figure 10B).

Hepatic regulatory enzymes of cholesterol metabolism

A 2-fold decrease was noted in HMG-CoA reductase activity in TD2 *Psammomys obesus* whereas a 1.5-fold increase was recorded in TD2 *Psammomys obesus* (data not shown), which confirmed our previous studies. (23)

Hepatic transcription factors

We have assessed the gene expression of various transcription factors, including LXR, PPAR and SREBP families, all known to modulate CHOL metabolism in the liver. While the mRNAs of LXR α and PPAR β/δ were augmented in the liver of TD2 *Psammomys obesus*, those of SREBP-2, LXR β and PPAR γ were unvariable (Figure 11A), with a decrease noted in SREBP-2 protein mass was observed (Figure 11B).

DISCUSSION

Patients with TD2 mellitus are at increased risk for the development of atherosclerosis, which is a major cause of mortality. Acquired deficiencies of lipoprotein lipase and VLDL receptor, coupled with an elevation of VLDL synthesis by the liver can, in part, account for the typical hypertriglyceridemia. Currently, growing evidence points to the small intestine as a major contributor of postprandial triglyceridemia. Whether the gut also participates to hypercholesterolemia in diabetes remains a matter of controversy. In the present work, we have attempted to clarify this issue in the *Psammomys obesus*, an animal model of obesity, IR and TD2, and comparisons were made with the liver in terms of CHOL transport and metabolism. According to our results, intestinal CHOL uptake was lower in diabetic animals compared to controls. Concomitantly, a decrease was observed in (i) intestinal gene and protein expression of NPC1L1, which plays a pivotal role in CHOL incorporation in the enterocytes; and (ii) intestinal ABCG5 and ABCA1 mRNA. Furthermore, jejunal PCSK9 was diminished and LDLr was reciprocally raised, whereas a significant downregulation characterized jejunal HMG-CoA reductase without any change in ACAT mRNA and activity. Finally, among the transcription factors tested, only an increase in LXR α and a decrease in PPAR β/δ was detected in the intestine. On the other hand, the liver was characterized by (i) an increase in the protein mass of NPC1L1, SR-BI and ANXA2; (ii) an upregulation of SR-BI mRNA; (iii) a fall in ABCG8 protein content, ABCG5 and ABCA1 mRNAs; and (iii) an augmentation in LXR α and PPAR β/δ mRNAs, as well as a drop in SREBP-2 protein.

According to our results, reduced CHOL absorption coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1 in *Psammomys obesus* with TD2. The reduced mRNA and protein mass of NPC1L1 along with the slight trend of fall in SR-BI and ANXA2 occurred in the jejunal part of the small intestine where most of CHOL absorption takes place.

Importantly, NPC1L1 represents a critical protein for CHOL absorption by the small intestine, since NPC1L1 knockout mice exhibited a reduction in intestinal CHOL absorption and are insensitive to ezetimibe (33, 34), a drug that lowers

serum CHOL by reducing CHOL absorption. In addition, the use of genetically-modified intestinal epithelial cells and ezetimibe support the central role for NPC1L1 in intestinal CHOL absorption. (28, 35, 36) Our findings are in line with previous investigations showing low CHOL absorption efficiency in TD2 subjects with mild hyperlipidemia (17) and in moderately overweight, markedly hypertriglyceridemic individuals affected by type 1 and TD2.(37) Furthermore, serum plant sterol levels, indicators of CHOL absorption efficiency, were low in TD2.(38) On the other hand, recent studies were unable to confirm these observations since they reported an increase in NPC1L1 and CM sterol content in human TD2 subjects.(39, 40) Although CHOL absorption may be species-dependent, additional work is required to determine the status of intestinal CHOL absorption in humans since available studies included only a limited number of patients.

In the intestine, ABCA1 transports CHOL from the epithelial cells to the bloodstream, contributing to approximately one-third of high-density lipoprotein (HDL) production. (41) Our results could document a substantial diminution in ABCA1 mRNA, which supports the low CHOL transport mediated by the downregulated NPC1L1.

ABCG5 and ABCG8 are implicated in mediating the efflux of dietary sterols from the gut. The increase in dietary phytosterol and CHOL absorption in sistoleemics strongly points to the function of ABCG5 and ABCG8 in preventing the movement of the bulk of plant sterols and CHOL beyond the enterocyte. (42, 43) In fact, ABCG5 and ABCG8 work in tandem to re-excrete a portion of the absorbed CHOL back into the lumen from the intestinal villi. Our study in diabetic *Psammomys obesus* showed a decrease in intestinal ABCG5 mRNA. However, despite this finding, net CHOL absorption was not positively influenced. Our data corroborate and extend previous reports that reported a reduction in intestinal ABCG5 and ABCG8 in human subjects with TD2. (39, 40)

For the first time, the present work attempted to detail the status of PCSK9 in intestinal cells. The small intestine of *Psammomys obesus* with TD2 displayed a

reduction in the protein mass of PCSK9 together with a rise in that of LDLr protein. Thus, the diabetic condition seems to control intestinal LDL-C levels by posttranslational regulation of the LDLr. It is possible that the limited provision of sterols to enterocytes by the reduced expression of CHOL transporters down-regulated the expression of PCSK9 in *Psammomys obesus* with TD2, which gives rise to LDLr protein capable to incorporate LDL-C for cellular needs. This is also consistent with the paradigm that has been developed so far: lowering intracellular CHOL leads to an enhancement in the rate of LDL receptor synthesis and LDL clearance, thereby resulting in the inhibition of HMG-CoA reductase, the key enzyme in the biosynthesis of CHOL. A trend of decrease in mRNA and activity, as well as a significant inhibition in protein expression of HMG-CoA reductase were indeed noticed in the jejunum of *Psammomys obesus* with TD2.

PCSK9 expression was strongly induced by statins in a dose-dependent manner in HepG2 cells and in human primary hepatocytes, likely a result of the CHOL-lowering effect of the drug, and that this induction was efficiently reversed by mevalonate. (44) Altogether, these studies pointed out that (i) the regulation of PCSK9 expression is dependent on the presence or absence of sterols not only in hepatocytes, but also in intestinal epithelial cells; and (ii) the modulation of PCSK9 by sterols, which are supplied either exogenously or endogenously, is achieved at the transcription level.

In our study, NPC1L1 protein was more expressed in the liver of TD2 *Psammomys obesus* than in controls. Although the exact function of hepatic NPC1L1 remains unknown, its localization in the canalicular membrane of monkey and human hepatocytes (36) contributes to the retention of biliary CHOL by hepatocytes. (45) Since overexpression of NPC1L1 in transgenic mice resulted in a 10- to 20-fold decrease in biliary CHOL concentration and was associated with 30%-60% increase in plasma CHOL hepatocytes (45), we propose that the enhanced NPC1L1 protein expression in the liver of *Psammomys obesus* with TD2 may significantly contribute to hypercholesterolemia. This suggestion is supported by the simultaneous lessening in the hepatic protein and mRNA of ABCG8 and

ABCG5, and ABCA1, respectively, which are actively involved in biliary CHOL output. (46, 47)

SR-B1 was identified as an HDLr. (48) Transient HDL binding to its hepatic receptors results in removal and internalization of CE from HDL₂ particles without degradation or uptake of the HDL apo constituents (49, 50). Hepatic SR-B1 abundance was increased in rats with diet-induced syndrome X. (51) It would appear that an increase in SR-B1 activity would be desirable, since this may enhance the delivery of HDL-CE to the liver. Accordingly, hepatic overexpression of SR-B1 led to a substantial increase in biliary CHOL and dramatically suppressed the development of atherosclerotic lesions in mice. (52) Consequently, the up-regulation of this scavenger receptor in the liver of *Psammomys obesus* with TD2 may be a compensatory response for the increase in NPC1L1.

ANXA2 belongs to the ANXA family of proteins that bind to phospholipid membranes in a Ca²⁺-dependent manner. Here we show an increase in its protein expression in the liver of *Psammomys obesus* with TD2. However, the significance of this finding remains to be explored since no specific role was defined for ANXA2 in the liver.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the J.A. de Sève Chair in nutrition, the Canadian Institutes of Health Research (Grant MOP 49433) and Canadian Diabetes Association. We thank Schohraya Spahis for her expert technical assistance.

REFERENCES

1. **Bierman EL.** George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb* 12: 647-656, 1992.
2. **Kannel WB and McGee DL.** Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation* 59: 8-13, 1979.
3. **Nathan DM, Lachin J, Cleary P, Orchard T, Brillon DJ, Backlund JY, O'Leary DH and Genuth S.** Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 348: 2294-2303, 2003.
4. **Ruderman NB, Williamson JR and Brownlee M.** Glucose and diabetic vascular disease. *FASEB J* 6: 2905-2914, 1992.
5. **Wilson PW.** Diabetes mellitus and coronary heart disease. *Am J Kidney Dis* 32: S89-100, 1998.
6. **Ginsberg HN.** Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. *Diabetes Care* 14: 839-855, 1991.
7. **Hayden JM and Reaven PD.** Cardiovascular disease in diabetes mellitus type 2: a potential role for novel cardiovascular risk factors. *Curr Opin Lipidol* 11: 519-528, 2000.
8. **Lewis GF, Naples M, Uffelman K, Leung N, Szeto L and Adeli K.** Intestinal lipoprotein production is stimulated by an acute elevation of plasma free fatty acids in the fasting state: studies in insulin-resistant and insulin-sensitized Syrian golden hamsters. *Endocrinology* 145: 5006-5012, 2004.
9. **Lewis GF, Uffelman K, Naples M, Szeto L, Haidari M and Adeli K.** Intestinal lipoprotein overproduction, a newly recognized component of insulin resistance, is ameliorated by the insulin sensitizer rosiglitazone: studies in the fructose-fed Syrian golden hamster. *Endocrinology* 146: 247-255, 2005.

10. **Zoltowska M, Ziv E, Delvin E, Sinnett D, Kalman R, Garofalo C, Seidman E and Levy E.** Cellular aspects of intestinal lipoprotein assembly in *Psammomys obesus*: a model of insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 2539-2545, 2003.
11. **Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP and Cokkinos DV.** Clinical relevance of postprandial lipaemia. *Curr Med Chem* 12: 1931-1945, 2005.
12. **Tanaka A.** Postprandial hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 11: 322-329, 2004.
13. **Turley SD, Daggy BP and Dietschy JM.** Psyllium augments the cholesterol-lowering action of cholestyramine in hamsters by enhancing sterol loss from the liver. *Gastroenterology* 107: 444-452, 1994.
14. **Kesaniemi YA and Miettinen TA.** Cholesterol absorption efficiency regulates plasma cholesterol level in the Finnish population. *Eur J Clin Invest* 17: 391-395, 1987.
15. **McMurry MP, Connor WE, Lin DS, Cerqueira MT and Connor SL.** The absorption of cholesterol and the sterol balance in the Tarahumara Indians of Mexico fed cholesterol-free and high cholesterol diets. *Am J Clin Nutr* 41: 1289-1298, 1985.
16. **Gylling H, Tuominen JA, Koivisto VA and Miettinen TA.** Cholesterol metabolism in type 1 diabetes. *Diabetes* 53: 2217-2222, 2004.
17. **Gylling H and Miettinen TA.** Cholesterol absorption, synthesis, and LDL metabolism in NIDDM. *Diabetes Care* 20: 90-95, 1997.
18. **Gylling H and Miettinen TA.** Cholesterol absorption and lipoprotein metabolism in type II diabetes mellitus with and without coronary artery disease. *Atherosclerosis* 126: 325-332, 1996.
19. **Miettinen TA, Gylling H, Tuominen J, Simonen P and Koivisto V.** Low synthesis and high absorption of cholesterol characterize type 1 diabetes. *Diabetes Care* 27: 53-58, 2004.

20. **Jarvisalo M, Raitakari O, Gylling H and Miettinen TA.** Cholesterol absorption and synthesis in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 29: 2300-2304, 2006.
21. **Gleeson A, Owens D, Collins P, Johnson A and Tomkin GH.** The relationship between cholesterol absorption and intestinal cholesterol synthesis in the diabetic rat model. *Int J Exp Diabetes Res* 1: 203-210, 2000.
22. **Levy E, Spahis S, Ziv E, Marette A, Elchebly M, Lambert M and Delvin E.** Overproduction of intestinal lipoprotein containing apolipoprotein B-48 in Psammomys obesus: impact of dietary n-3 fatty acids. *Diabetologia* 49: 1937-1945, 2006.
23. **Zoltowska M, Ziv E, Delvin E, Stan S, Bar-On H, Kalman R and Levy E.** Circulating lipoproteins and hepatic sterol metabolism in Psammomys obesus prone to obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Atherosclerosis* 157: 85-96, 2001.
24. **Zoltowska M, Ziv E, Delvin E, Lambert M, Seidman E and Levy E.** Both insulin resistance and diabetes in Psammomys obesus upregulate the hepatic machinery involved in intracellular VLDL assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 118-123, 2004
25. **Levy E, Garofalo C, Rouleau T, Gavino V and Bendayan M.** Impact of essential fatty acid deficiency on hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 23: 848-857, 1996.
26. **Livak KJ and Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
27. **Courtois F, Suc I, Garofalo C, Ledoux M, Seidman E and Levy E.** Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G12-G19, 2000.

28. **Sane AT, Sinnett D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Menard D, Beaulieu JF and Levy E.** Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* 47: 2112-2120, 2006.
29. **Horton JD, Cohen JC and Hobbs HH.** Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci* 32: 71-77, 2007.
30. **Lambert G.** Unravelling the functional significance of PCSK9. *Curr Opin Lipidol* 18: 304-309, 2007.
31. **Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A and Chretien M.** The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 928-933, 2003.
32. **Seidah NG and Prat A.** The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med* 85: 685-696, 2007.
33. **Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N and Graziano MP.** Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303: 1201-1204, 2004.
34. **Davis HR, Jr., Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP and Altmann SW.** Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 279: 33586-33592, 2004.
35. **Field FJ, Watt K and Mathur SN.** Ezetimibe interferes with cholesterol trafficking from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 48: 1735-1745, 2007.
36. **Yu L, Bharadwaj S, Brown JM, Ma Y, Du W, Davis MA, Michaely P, Liu P, Willingham MC and Rudel LL.** Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem* 281: 6616-6624, 2006.

37. **Briones ER, Steiger DL, Palumbo PJ, O'Fallon WM, Langworthy AL, Zimmerman BR and Kottke BA.** Sterol excretion and cholesterol absorption in diabetics and nondiabetics with and without hyperlipidemia. *Am J Clin Nutr* 44: 353-361, 1986.
38. **Sutherland WH, Scott RS, Lintott CJ, Robertson MC, Stapely SA and Cox C.** Plasma non-cholesterol sterols in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 24: 172-175, 1992.
39. **Lally S, Tan CY, Owens D and Tomkin GH.** Messenger RNA levels of genes involved in dysregulation of postprandial lipoproteins in type 2 diabetes: the role of Niemann-Pick C1-like 1, ATP-binding cassette, transporters G5 and G8, and of microsomal triglyceride transfer protein. *Diabetologia* 49: 1008-1016, 2006.
40. **Lally SE, Owens D and Tomkin GH.** Sitosterol and cholesterol in chylomicrons of type 2 diabetic and non-diabetic subjects: the relationship with ATP binding cassette proteins G5 and G8 and Niemann-Pick C1-like 1 mRNA. *Diabetologia* 50: 217-219, 2007.
41. **Attie AD.** ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. *Trends Biochem Sci* 32: 172-179, 2007.
42. **Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R and Hobbs HH.** Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290: 1771-1775, 2000.
43. **Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, Kojima H, Allikmets R, Sakuma N, Pegoraro R, Srivastava AK, Salen G, Dean M and Patel SB.** Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* 27: 79-83, 2001.
44. **Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L and Prat A.** Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1454-1459, 2004.

45. **Temel RE, Tang W, Ma Y, Rudel LL, Willingham MC, Ioannou YA, Davies JP, Nilsson LM and Yu L.** Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *J Clin Invest* 117: 1968-1978, 2007.
46. **Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC and Hobbs HH.** Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 110: 671-680, 2002.
47. **Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von BK, Lutjohann D, Cohen JC and Hobbs HH.** Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16237-16242, 2002.
48. **Krieger M.** Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 108: 793-797, 2001.
49. **Acton SL, Scherer PE, Lodish HF and Krieger M.** Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem* 269: 21003-21009, 1994.
50. **Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH and Krieger M.** Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-520, 1996.
51. **Roberts CK, Liang K, Barnard RJ, Kim CH and Vaziri ND.** HMG-CoA reductase, cholesterol 7 α -hydroxylase, LDL receptor, SR-B1, and ACAT in diet-induced syndrome X. *Kidney Int* 66: 1503-1511, 2004.
52. **Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER and Krieger M.** Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 387: 414-417, 1997.

Table 1: Primer sequences used to determine gene expression by Quantitative RT-PCR

Gene	Sequences
ABCA-1	F 5'- GCA TCC TCT GGT TTA GCT GG -3'
	R 5'- ACC ACG CTG GGG TCA CTA TA -3'
ABCG-5	F 5'- GTC AGC GAC CAG GAG AGT C -3'
	R 5'- GGA TAC AAG CCC AGA GTC CA -3'
ACAT-2	F 5'- GTG TAT CAA GAT GGG CTG TG -3'
	R 5'- GTA GAA GAA CCC CAG GAC GA -3'
ANAX-2	F 5'- CTC GCA GTG AAG TGG ACA TG -3'
	R 5'- GCC TCC TGG TAG TCA CCC TT -3'
GAPDH	F 5'- CCTGCACCACCAACTGCTTAGC -3'
	R 5'- CTTCCGGTACGGTCACTCGAAG -3'
HMG-CoA reductase	F 5'- TGC AGA TGC TAG GTG TTC AAG -3'
	R 5'- TGA CAA GAT GTC CTG CTG CC -3'
LDLr	F 5'- TGA CGG GCT GGC GGT AGA CT-3'
	R 5'- CCC AAT CTG TCC AGT ACA TGA AGC C -3'
LXR α	F 5'- GCT GCA AGG GAT TCT TCC GCC -3'
	R 5'- ACT CCT CCC TCA TGC CTG CCT -3'
LXR β	F 5'- TGC AGG TGG AGT TCA TCA ACC C -3'
	R 5'- CGC AGG CTC ACC AGC TTC AT -3'
NPC1-L1	F 5'- ATC CAG TAT GCC AGT GAA TT -3'
	R 5'- GAA CCA GGG CAG GTA CTT AT -3'
SR-B1	F 5'- GTC TAC AGG GAG TTC AGA CA -3'
	R 5'- TAG GCA GTA CAA TGT AGT CAC -3'
SREBP-2	F 5'- CTC CGC AGA CGA GGA TCA TCC AG -3'
	R 5'- CAG GGC TGC CAT CTG TGT TCA G -3'
PCSK9	F 5'-CTG AAG TTG CCC CAT GTG GAG TA-3'
	R 5'-GGT ATC TAA GAG ATA CAC CTC CAC-3'
PPAR α	F 5'- TGC ATG TCC GTG GAG ACC GT -3'
	R 5'- CAG CAT CCC GTC TTT GTT CAT CA -3'
PPAR δ	F 5'- GCC CTT CAG TGA CAT CAT TGA GCC C -3'
	R 5'- GCA GCT TGG GGA AGA GGT ACT GG -3'
PPAR γ	F 5'- CCT GCG GAA GCC CTT TGG TGA CTT -3'
	R 5'- TTC ACG TTC AGC AAG CCT GGG C -3'

FIGURE LEGENDS

- Figure 1** Physical and biochemical characteristics of *Psammomys obesus*. Following the sacrifice of normal and diabetic *Psammomys obesus*, various measures were recorded in order to define the two animal groups. Values are means \pm SEM for control (n=9) and diabetic (n=8) animals. * $p<0,007$; ** $p<0,01$; *** $p<0,0001$ vs controls.
- Figure 2** Cholesterol uptake in *Psammomys obesus* intestinal explants. Jejunal explants were exposed to 100 μ M CHOL containing 300000 DPM [14 C]-CHOL for 60 min. After washing and homogenization, the radioactivity of intestinal samples was quantitated as described in materials and methods. Values are means \pm SEM for control (n=6) and diabetic (n=6) animals. * $p<0.0001$
- Figure 3** Gene and protein expression of intestinal transporters mediating cholesterol influx in *Psammomys obesus*. Following homogenization of jejunal specimens, proteins (A) from the animal groups were run on SDS-PAGE and immunoblotted against the transporters NPC1L1, SR-BI and ANXA2, as well as β -actin. All the results were normalized to β -actin. (B) Quantitative RT-PCR was performed using Quantitect SYBR Green kit and primer targeting gene sequences of NPC1L1, SR-BI, ANXA2 and GAPDH

(housekeeping gene) following cDNA synthesis and total RNA extraction from jejunal specimens. All results were normalized to GAPDH. Data are expressed as means \pm SEM for the controls ($n = 9$) and diabetic ($n = 8$). * $p < 0.006$; ** $p < 0.06$ versus controls

Figure 4 Expression of intestinal ABCA1 and ABCG5/G8 transporters mediating cholesterol efflux in *Psammomys obesus*. Following homogenization of jejunal specimens, proteins (A) from the animal groups were run on SDS-PAGE and immunoblotted against the transporters ABCG8 and β -actin. All the results were normalized to β -actin. (B) Quantitative RT-PCR was performed using Quantitect SYBR Green kit and primer targeting gene sequences of ABCG5, ABCA1 and GAPDH (housekeeping gene) following cDNA synthesis and total RNA extraction from jejunal specimens. All results were normalized to GAPDH. Data are expressed as means \pm SEM for the controls ($n = 9$) and diabetic ($n = 8$). * $p < 0.03$; ** $p < 0.04$ versus controls.

Figure 5 Gene and protein expression of intestinal PCSK9 and LDLr in *Psammomys obesus*. Following homogenization of jejunal specimens, proteins (A) from the animal groups were run on SDS-PAGE and immunoblotted against the transporters PCSK9 and LDLr. All the results were normalized to β -actin. (B) Quantitative RT-PCR was performed using Quantitect SYBR Green kit and primer targeting gene sequences of PCSK9, LDLr and GAPDH

(housekeeping gene) following cDNA synthesis and total RNA extraction from jejunal specimens. All results were normalized to GAPDH. Data are expressed as means \pm SEM for the controls ($n = 9$) and diabetic ($n = 8$). * $p < 0.03$; ** $p < 0.01$ versus controls.

Figure 6 Intestinal expression and activity of HMG-CoA reductase and ACAT in *Psammomys obesus*. Panel A represents HMG-CoA reductase mRNA, protein and activity, whereas Panel B illustrates ACAT2 mRNA and ACAT activity. Gene expression was analyzed by quantitative RT-PCR, protein levels by Western blot and activity using labeled precursors as described in Research Design and Methods. Data are expressed as means \pm SEM for the controls ($n = 8$) and diabetic ($n = 8$). * $p < 0.02$ versus controls.

Figure 7 Intestinal expression of transcription factors in *Psammomys obesus*. The transcript levels of LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ and SREBP-2 were assessed by quantitative RT-PCR. SREBP-2 protein mass was evaluated by Western blot. Data are expressed as means \pm SEM for the controls ($n = 9$) and diabetic ($n = 8$). * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ versus controls.

Figure 8 Gene and protein expression of hepatic transporters mediating cholesterol influx in *Psammomys obesus*. Following homogenization

of liver specimens, proteins (A) from the animal groups were run on SDS-PAGE and immunoblotted against the transporters NPC1L1, SR-BI and ANXA2, as well as β -actin. All the results were normalized to β -actin. (B) Quantitative RT-PCR was performed using Quantitect SYBR Green kit and primer targeting gene sequences of NPC1L1, SR-BI, ANXA2 and GAPDH (housekeeping gene) following cDNA synthesis and total RNA extraction from liver specimens. All results were normalized to GAPDH. Data are expressed as means \pm SEM for the controls ($n = 9$) and diabetic ($n = 8$). * $p < 0.002$; ** $p < 0.005$ versus controls.

Figure 9

Expression of hepatic ABCA1 and ABCG5/G8 transporters mediating cholesterol efflux in *Psammomys obesus*. Following homogenization of liver specimens, proteins (A) from the animal groups were run on SDS-PAGE and immunoblotted against the transporters ABCG8 and β -actin. All the results were normalized to β -actin. (B) Quantitative RT-PCR was performed using Quantitect SYBR Green kit and primer targeting gene sequences of ABCG5, ABCA1 and GAPDH (housekeeping gene) following cDNA synthesis and total RNA extraction from liver specimens. All results were normalized to GAPDH. Data are expressed as means \pm SEM for the controls ($n = 9$) and diabetic ($n = 8$). * $p < 0.01$; ** $p < 0.005$ versus controls.

Figure 10 Gene and protein expression of hepatic PCSK9 and LDLr in *Psammomys obesus*. Following homogenization of liver specimens, proteins (A) from the animal groups were run on SDS-PAGE and immunoblotted against the transporters PCSK9 and LDLr. All the results were normalized to β -actin. (B) Quantitative RT-PCR was performed using Quantitect SYBR Green kit and primer targeting gene sequences of PCSK9, LDLr and GAPDH (housekeeping gene) following cDNA synthesis and total RNA extraction from liver specimens. All results were normalized to GAPDH. Data are expressed as means \pm SEM for the controls ($n = 9$) and diabetic ($n = 8$).

Figure 11 Hepatic expression of transcription factors in *Psammomys obesus*. The transcript levels of LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ and SREBP-2 were assessed by quantitative RT-PCR. SREBP-2 protein mass was evaluated by Western blot. Data are expressed as means \pm SEM for the controls ($n = 9$) and diabetic ($n = 8$). * $p < 0.01$; ** $p < 0.003$ versus controls.

Figure 1

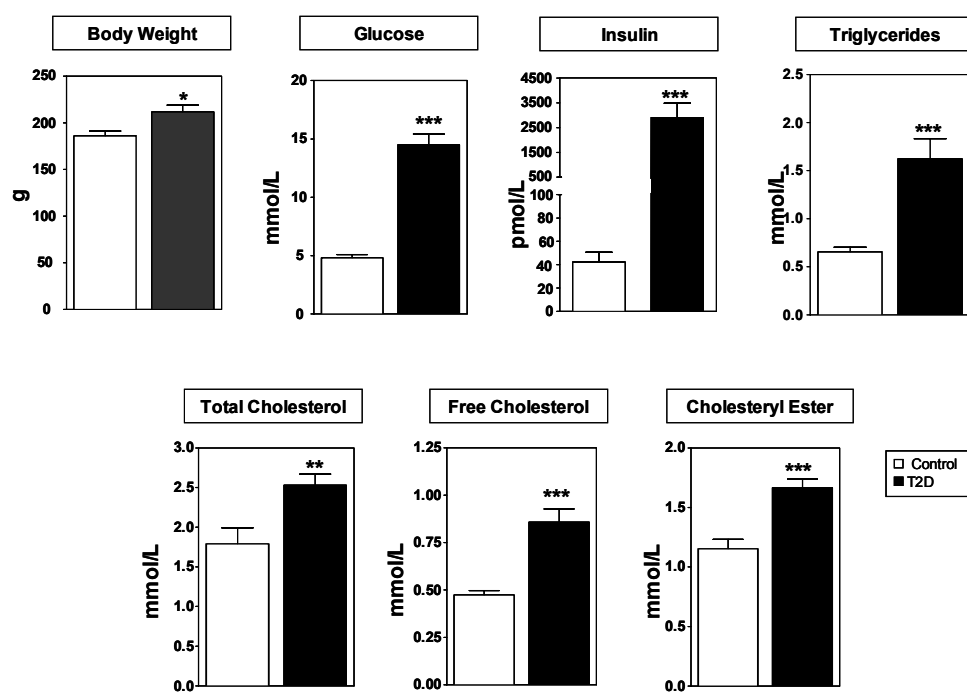


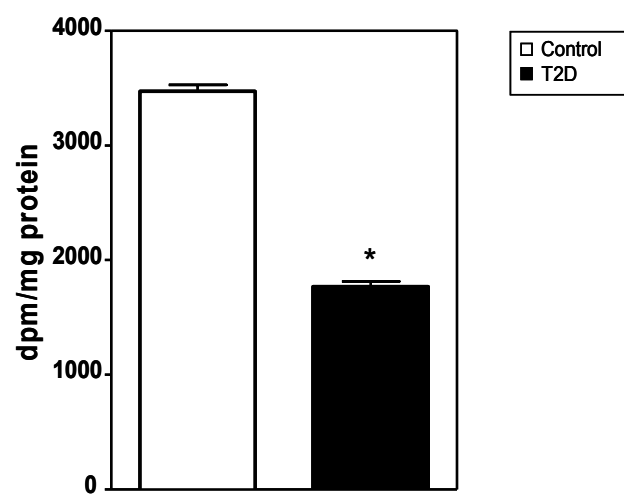
Figure 2

Figure 3

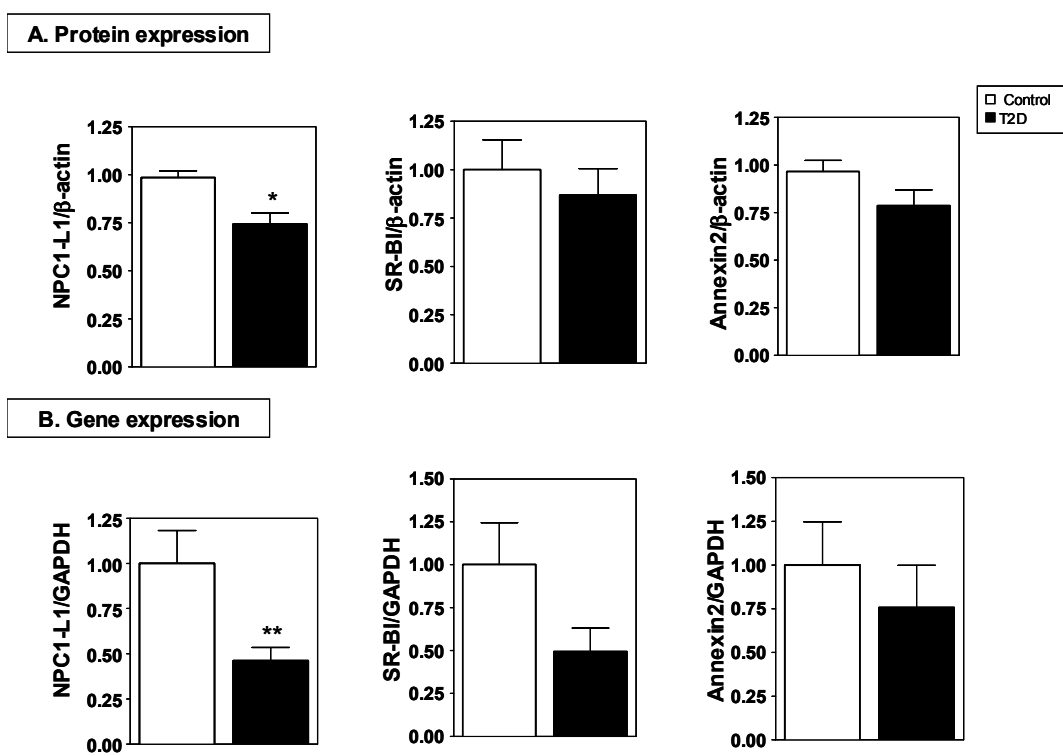


Figure 4

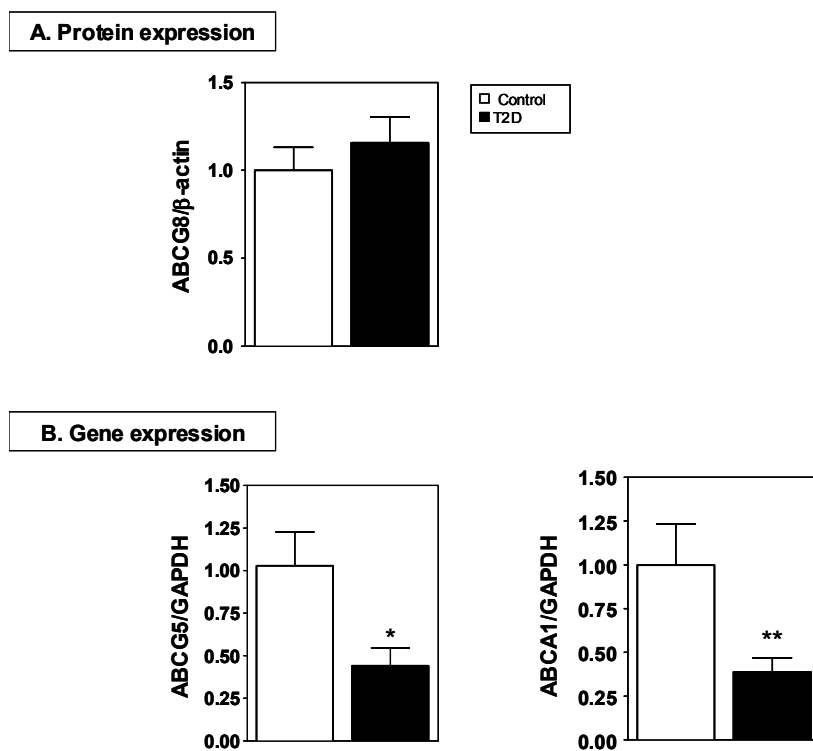


Figure 5

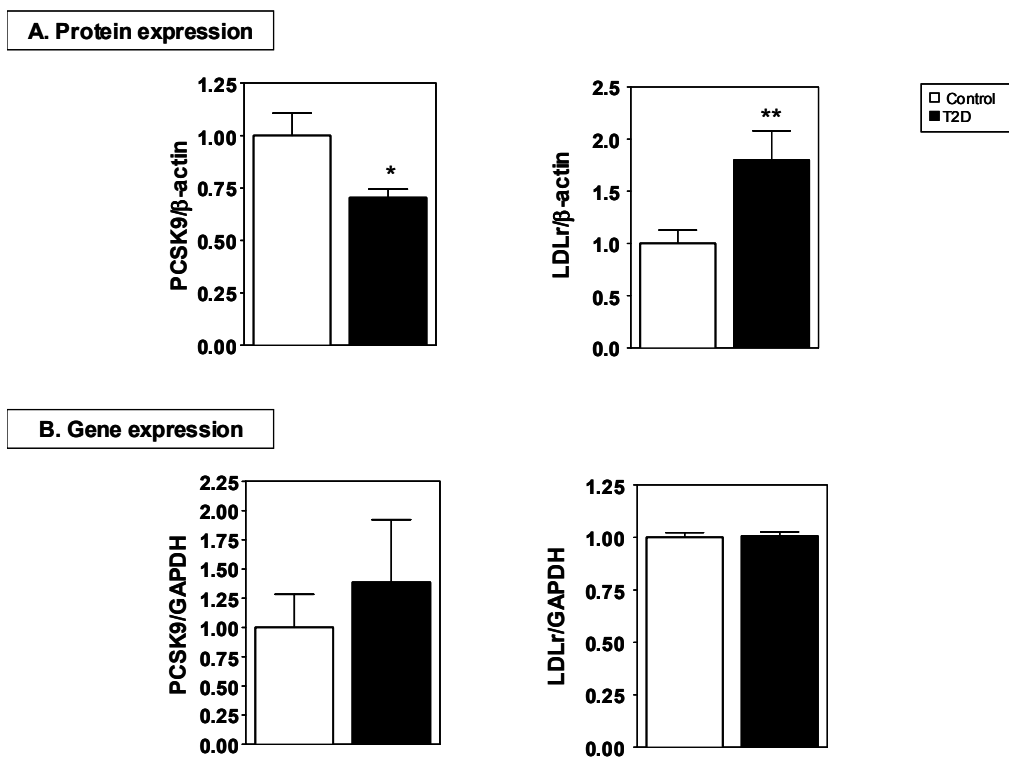


Figure 6

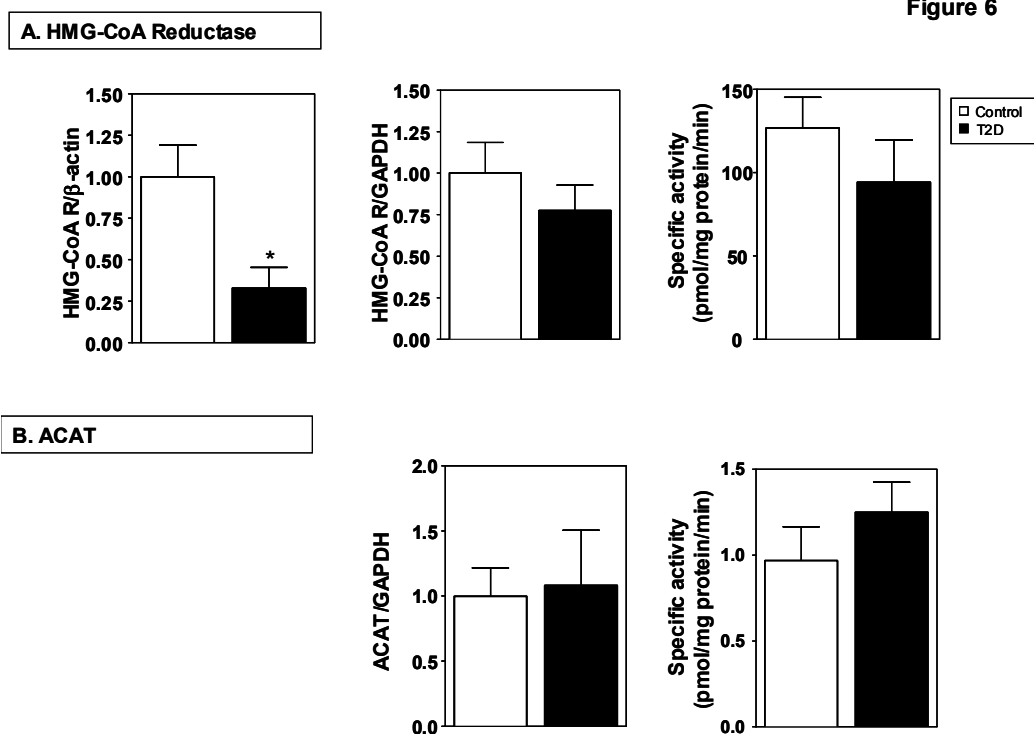


Figure 7

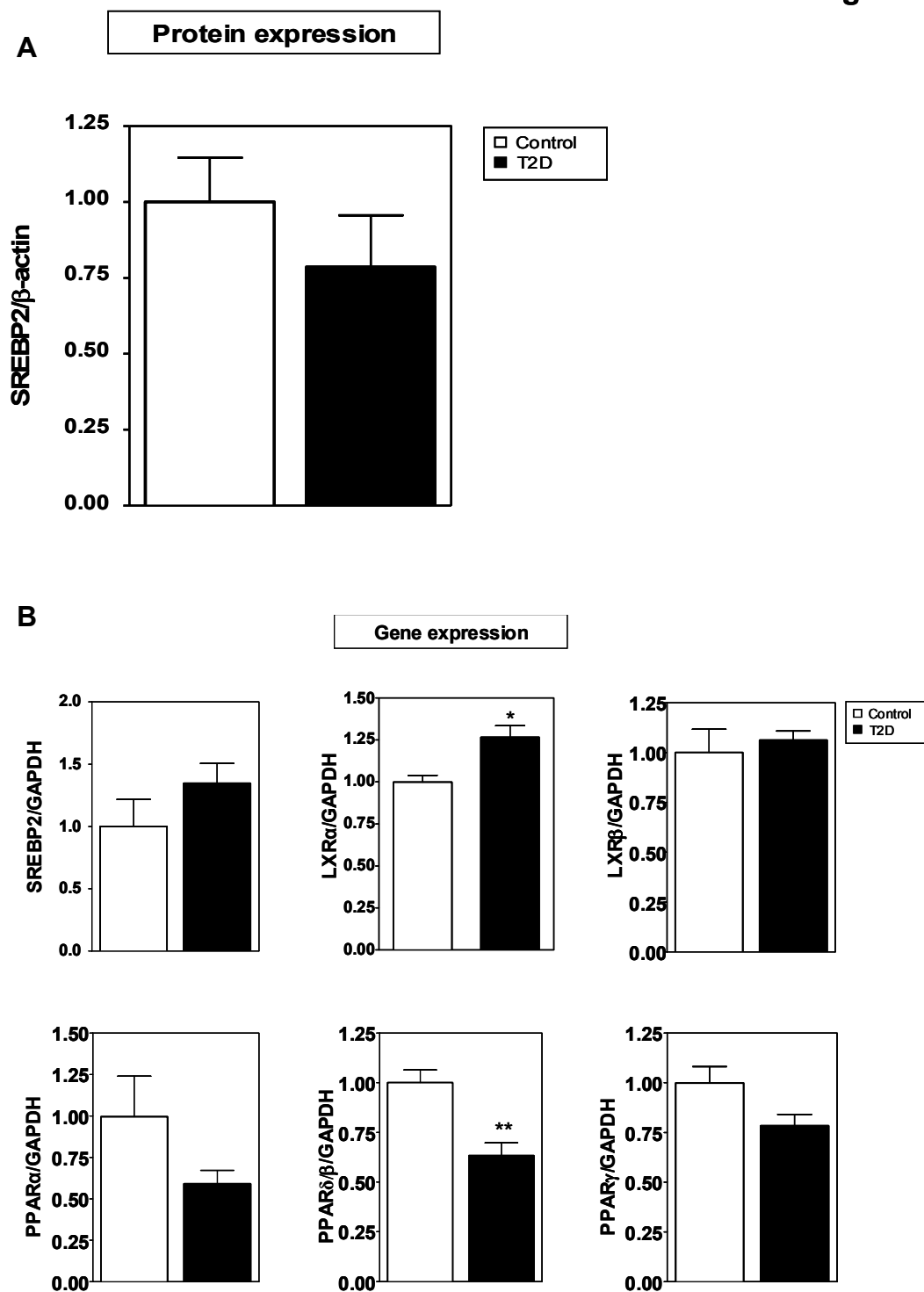


Figure 8

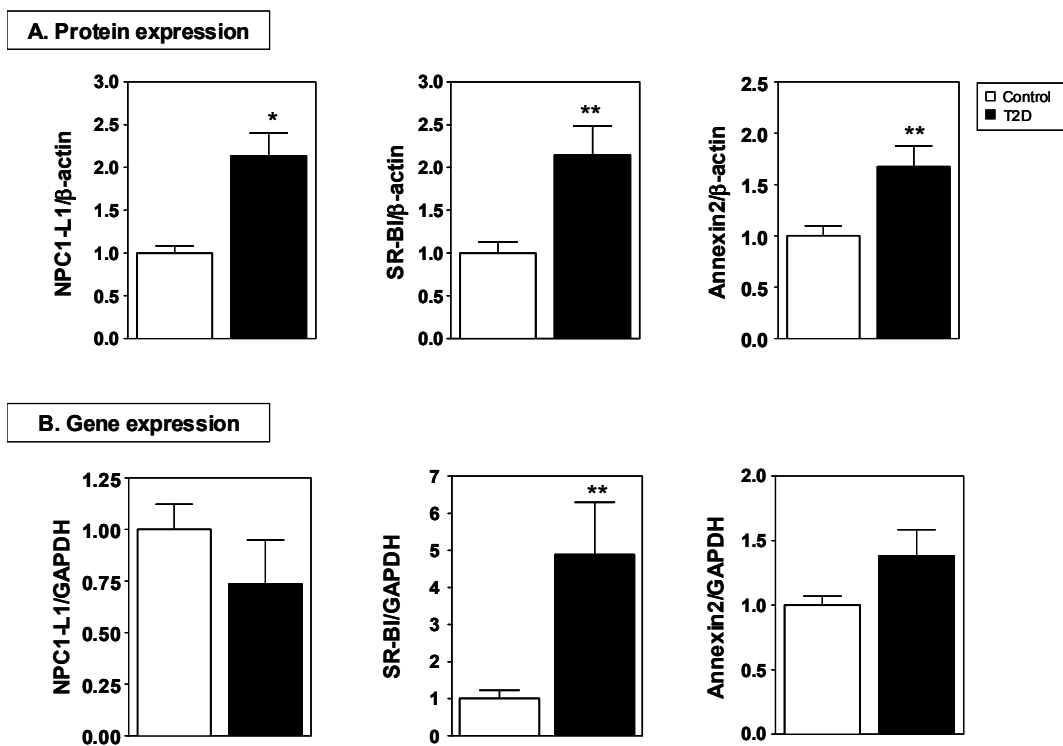


Figure 9

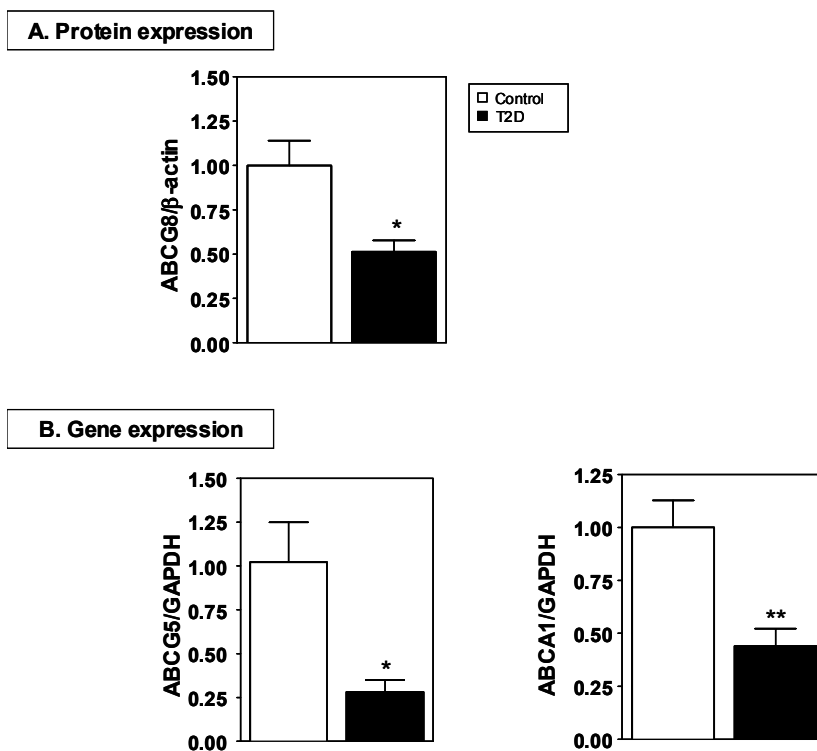


Figure 10

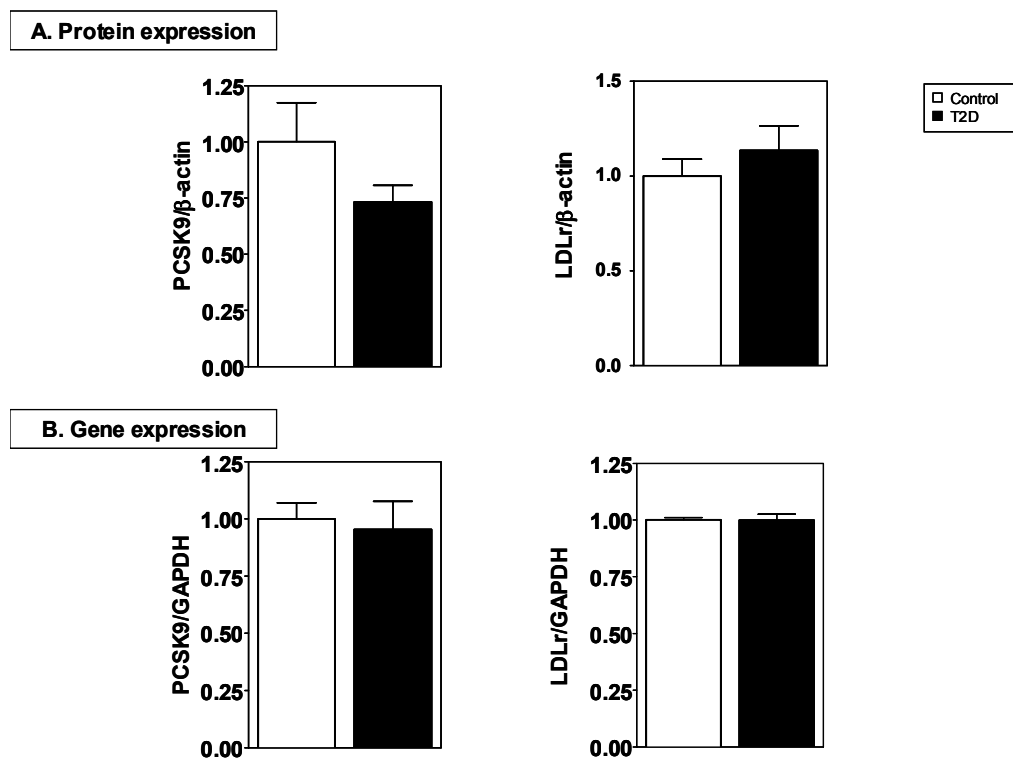
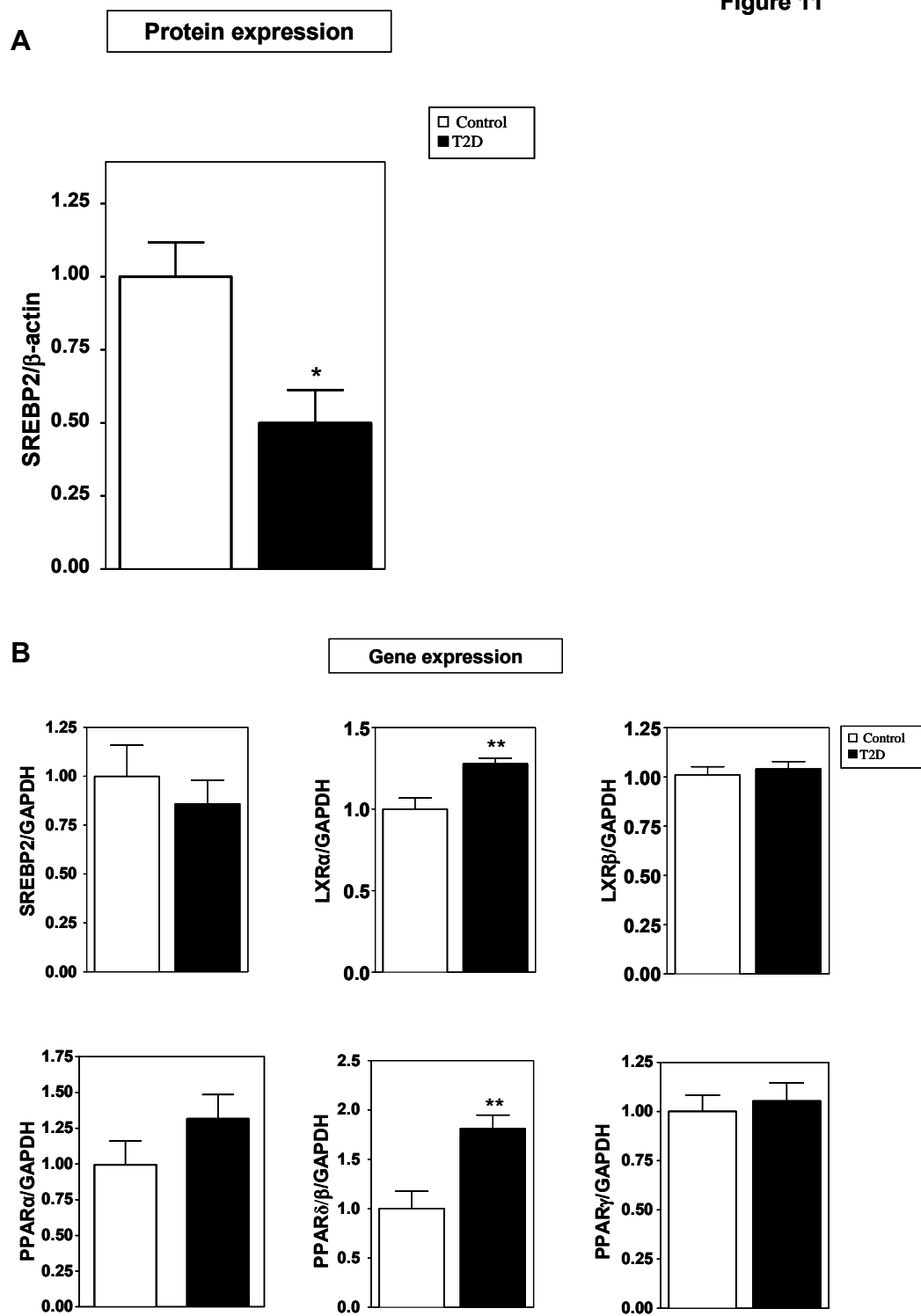


Figure 11

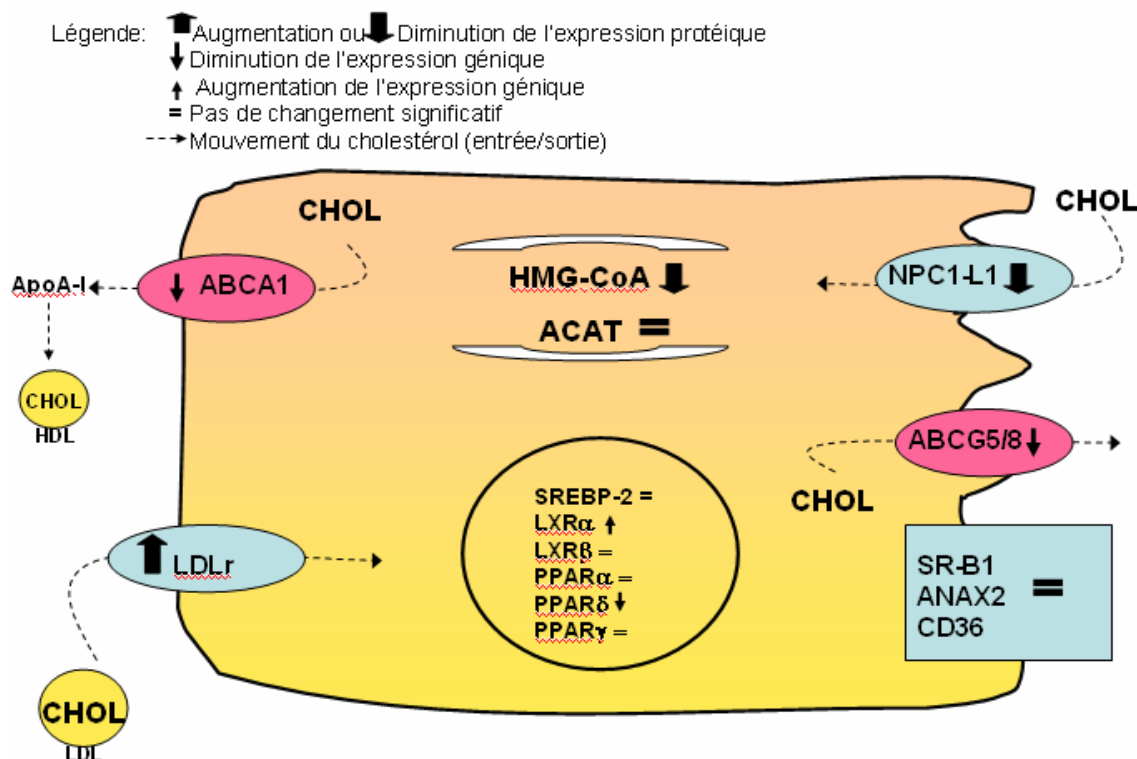


4. DISCUSSION

Les patients atteints du DT2 ont 2 à 3 fois plus de risques de développer une athérosclérose et une maladie cardiovasculaire, principales causes de mortalité. Une déficience de la LPL et des récepteurs des VLDLs, associée à une augmentation de la synthèse hépatique des VLDLs contribue, en partie, à l'hypertriglycéridémie caractéristique. Bien que de plus en plus d'évidences suggèrent que l'intestin grêle contribue à l'hypertriglycéridémie post-prandiale présente chez les diabétiques, cette implication demeure sujet de discussion. L'objectif premier du travail présenté dans ce mémoire est de clarifier le rôle de l'intestin dans l'hypercholestérolémie associée au DT2. Pour ce faire, nous avons défini le statut protéique et génique des différents composants du transport hépatique et intestinal du cholestérol chez le *Psammomys obesus*, un modèle animal de l'obésité associée à la résistance à l'insuline et au DT2.

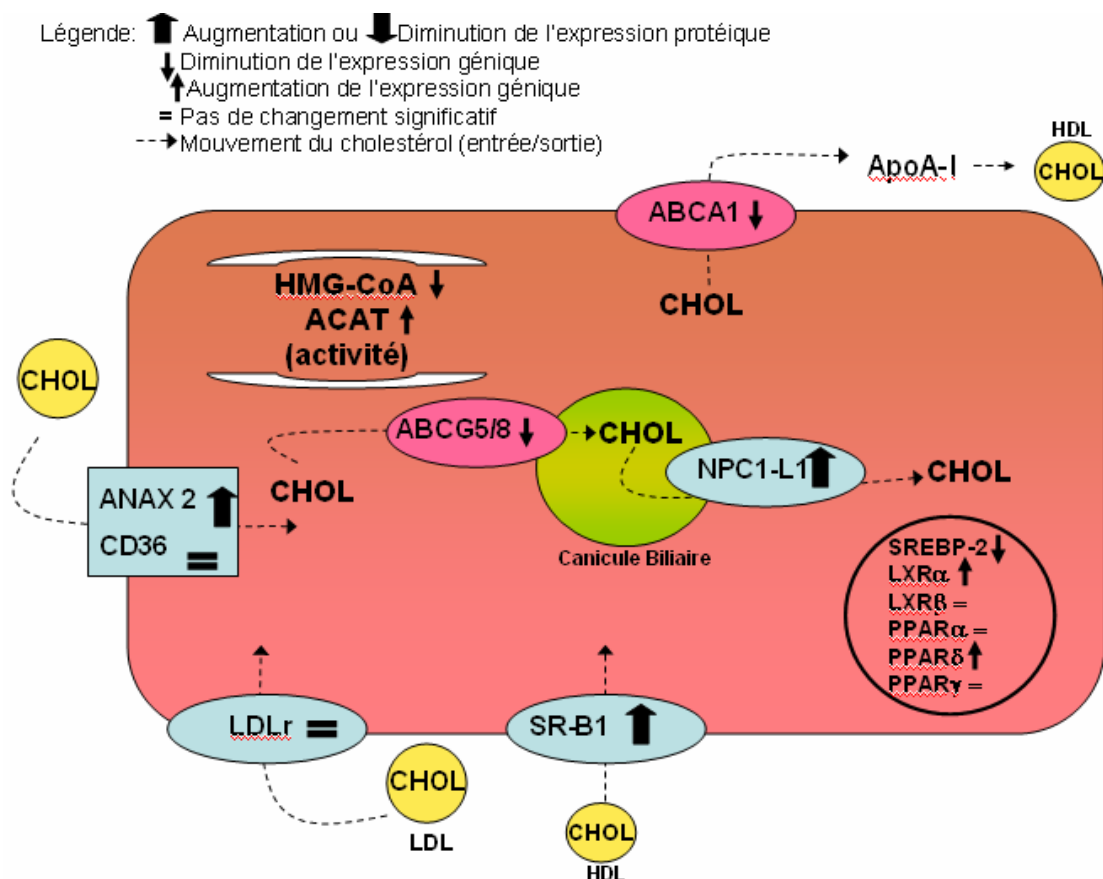
Nos résultats démontrent que l'absorption intestinale du cholestérol est diminuée chez les animaux diabétiques par rapport aux contrôles. Cette diminution est concomitante à celle de l'expression génique et protéique de NPC1-L1, intervenant majeur dans l'absorption intestinale du cholestérol ainsi que de l'expression génique de l'ABCG5 et de l'ABCA1, responsables de l'efflux du cholestérol, et celle de l'expression protéique du PCSK9 au niveau du jejunum. Par ailleurs, nous avons observé une augmentation de la quantité de LDLr. Aucune différence n'a cependant été observée pour le SR-B1, l'Annexine II et le CD36, les autres transporteurs intestinaux du cholestérol étudiés. En ce qui a trait aux enzymes impliquées dans la synthèse et l'estérification du cholestérol, une diminution protéique de la HMG-CoA réductase caractérise les animaux diabétiques, tandis qu'aucune différence n'est observée au niveau de l'expression génique ou de l'activité de l'ACAT. Finalement, de tous les facteurs de transcription testés, seule une augmentation de LXR α et une diminution PPAR β/δ est détectée au niveau intestinal.

Figure 13 : Représentation schématique des résultats obtenus au niveau intestinal chez les *Psammomys obesus* diabétiques



Au niveau hépatique, nous observons, chez les animaux diabétiques, une augmentation de la masse protéique du SR-B1, du NPC1-L1 et de l'Annexine II. Bien qu'aucun changement ne soit noté au niveau de l'expression génique du NPC1-L1 et de l'Annexine II, nous remarquons une augmentation significative de l'ARNm de SR-B1. Pour ce qui est des transporteurs ABC, les animaux diabétiques exhibent une diminution du contenu protéique de l'ABCG8 et de l'expression génique de l'ABCG5 et de l'ABCA1. Finalement, une augmentation de l'ARNm de LXR α et de PPAR β/δ et une diminution de la forme active de la protéine SREBP-2 caractérisent le foie des animaux atteints du DT2.

Figure 14 : Représentation schématique des résultats obtenus au niveau hépatique chez les *Psammomys obesus* diabétiques



La diminution de l'expression génique et de la masse protéique de NPC1-L1, ainsi que la tendance à la baisse du SR-B1 et de l'Annexine II coïncide avec réduction de l'absorption du cholestérol au niveau du jejunum, partie de intestin grêle où la majorité du cholestérol est absorbée. Depuis quelques années, le NPC1-L1 est reconnu comme étant un facteur important dans l'absorption intestinale de cholestérol. En effet, on observe une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol, tout comme une perte de sensibilité à l'Ezetimibe, un médicament prescrit pour diminuer le taux de cholestérol plasmatique en réduisant son absorption, chez des souris déficientes en NPC1-L1.^{49, 178} De plus, le rôle central du NPC1-L1 dans l'absorption intestinale du cholestérol a été mis en évidence grâce à l'utilisation de cellules

génétiqnement modifiées.^{51, 179} Nos résultats appuient ceux constatés précédemment qui montrent que les patients diabétiques ayant une légère hyperlipidémie et un surplus de poids¹⁵⁵, et les individus atteints d'un diabète de type 1 ou de type 2, avec un surplus de poids substantiel et une hypertriglycéridémie majeure¹⁸⁰, présentent une diminution de l'absorption du cholestérol. De plus, les taux de stérols végétaux, indicateurs fiables de l'efficacité de l'absorption intestinale du cholestérol, sont diminués dans le DT2.¹⁸¹ Toutefois, cette observation n'a pas pu être confirmée, puisque les travaux de Lally et coll.^{3, 182} ont démontré une augmentation de la masse protéique de NPC1-L1 et du contenu en cholestérol des chylomicrons, chez des individus souffrant du DT2. Notons qu'à l'heure actuelle les études cliniques ont été effectuées avec un nombre restreint de patients. Des études additionnelles sont donc requises afin de mieux définir le statut de l'absorption intestinale du cholestérol chez l'humain.

Au niveau de l'intestin, la protéine transmembranaire basolatérale ABCA1 transporte le cholestérol des cellules épithéliales à la circulation via l'apo A-I, contribuant ainsi approximativement au tiers de la production des HDLs.¹⁸³ Chez les *Psammomys obesus* diabétiques, nous observons une diminution importante de l'expression génique de l'ABCA1, ce qui est cohérent avec une diminution du transport du cholestérol (au niveau apical de la cellule) associée à la régulation à la baisse de NPC1-L1.

Les transporteurs ABCG5 et ABCG8, situés sur la membrane apicale des entérocytes, travaillent en tandem pour ré-excréter dans la lumière intestinale une partie du cholestérol absorbé. Nos travaux montrent que chez les animaux diabétiques l'expression génique de l'ABCG5 est diminuée tandis que la masse protéique de l'ABCG8 reste inchangée. Malgré ces résultats, l'absorption intestinale nette du cholestérol n'est pas augmentée. Ces observations corroborent avec celles rapportées précédemment chez des

patients atteints du DT2 qui présentent des taux d'ARNm de l'ABCG5/8 réduits au niveau intestinal.^{3, 153}

Nos travaux sont les premiers dans lesquels le statut de PCSK9 dans la cellule intestinale est étudié dans le DT2. L'intestin grêle des *Psammomys obesus* présente une réduction de la masse protéique de PCSK9, associée à une augmentation de l'expression protéique du récepteur des LDLs. L'état diabétique semble donc contrôler les taux de LDL intestinal en régulant de façon post-transcriptionnel le récepteur de ces lipoprotéines. Il est possible que l'approvisionnement limité en stérol au niveau de l'entérocyte (attribuable à la diminution des transporteurs du cholestérol, tels que NPC1-L1) entraîne une régulation à la baisse de PCSK9 chez les animaux diabétiques, provoquant une élévation de la protéine LDLr en permettant ainsi d'incorporer le cholestérol nécessaire au besoin cellulaire. Ces résultats sont cohérents avec le paradigme développé il y a plusieurs années voulant qu'une diminution du cholestérol intracellulaire entraîne une augmentation protéique du LDLr et de la clairance des LDLs, résultant en une inhibition de l'activité de la HMG-CoA réductase, enzyme clé de la synthèse du cholestérol. Au niveau du jéjunum des *Psammomys obesus* diabétiques, une réduction significative de l'expression protéique de la HMG-CoA réductase est observée, tandis que seule une tendance à la baisse est notée en ce qui concerne son expression génique et son activité.

Au niveau du foie, la protéine NPC1-L1 est plus abondamment exprimée chez les animaux diabétiques. Toutefois, sa fonction exacte demeure plus ou moins connue. Sa localisation au niveau des membranes canaliculaires des singes et des humains, suggère un rôle dans la rétention du cholestérol biliaire par les hépatocytes.^{55, 56} Cette hypothèse est étayée par le fait que la surexpression hépatique du NPC1-L1 chez les souris transgéniques est associée à une diminution de 10 à 20 fois de la concentration du cholestérol biliaire et à une augmentation de 30% à 60% du cholestérol plasmatique.⁵⁶ Par extension, ceci laisse supposer que l'élévation protéique du NPC1-L1

hépatique des *Psammomys obesus* diabétiques peut contribuer de façon significative à l'hypercholestérolémie associée au DT2. Ce résultat est appuyé par la réduction hépatique de la protéine ABCG8 et de l'ARNm de l'ABCA1, et de l'ABCG5.^{76, 77} En résumé, l'augmentation de NPC1-L1 au niveau du foie des animaux diabétiques permet une plus grande réabsorption du cholestérol biliaire pour l'incorporer aux hépatocytes alors qu'une diminution des ABCG5/8 freine l'excrétion du cholestérol dans la bile.

Le transporteur SR-BI est reconnu principalement comme étant le récepteur des HDLs.¹⁸⁴ La liaison transitoire de ces lipoprotéines à leur récepteur hépatique entraîne l'internalisation du cholestérol-ester, présent dans les particules HDL-2, sans toutefois causer la dégradation ou la capture des apolipoprotéines qui constituent les HDLs.^{21, 23} Une étude effectuée sur des rats, chez lesquels le syndrome X avait été induit à l'aide d'une diète riche en lipides, a montré que l'expression protéique de SR-B1 est augmentée chez les animaux atteints de ce syndrome.¹⁴⁹ Une augmentation de l'activité de SR-B1 hépatique peut sembler désirable, puisque cela favorise l'apport du cholestérol-ester au foie. En effet, une surexpression de SR-B1 entraîne une augmentation substantielle du cholestérol biliaire et supprime dramatiquement le développement des lésions athérosclérotiques.²⁶ La régulation hépatique à la hausse de SR-B1 des *Psammomys obesus* diabétiques peut donc être interprétée comme une réponse compensatoire à l'augmentation de NPC1-L1 et à la diminution des transporteurs ABCG5 et ABCG8.

Une augmentation protéique hépatique de l'ANAX II, membre de la famille des Annexines qui lient les phospholipides membranaires de façon calcium-dépendante, est observée chez les animaux diabétiques. Toutefois, l'impact de cette élévation doit être exploré puisque aucun rôle spécifique de cette protéine n'a été défini dans le foie.

En conclusion, les résultats obtenus chez le *Psammomys obesus* semblent montrer que l'hypercholestérolémie associée au DT2, ne serait pas attribuable à l'intestin proximal, mais plutôt aux altérations retrouvées au niveau hépatique. En effet, la diminution de l'expression de l'ABCG5/8 et l'augmentation de la masse protéique de NPC1-L1 agiraient de concert pour empêcher l'excrétion du cholestérol dans la bile. Le cholestérol s'accumulerait ainsi dans les cellules puis serait ensuite incorporé dans la formation des VLDLs. Le petit intestin semblerait répondre à cette augmentation de cholestérol plasmatique en diminuant l'absorption du cholestérol.

5. BIBLIOGRAPHIE

1. Goldstein BJ. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2002;90:3G-10G.
2. Taskinen MR. Diabetic dyslipidemia. *Atheroscler Suppl* 2002;3:47-51.
3. Lally S, Tan CY, Owens D, Tomkin GH. Messenger RNA levels of genes involved in dysregulation of postprandial lipoproteins in type 2 diabetes: the role of Niemann-Pick C1-like 1, ATP-binding cassette, transporters G5 and G8, and of microsomal triglyceride transfer protein. *Diabetologia* 2006;49:1008-16 Epub 2006 Mar 4.
4. Iovine C, Vaccaro O, Gentile A, Romano G, Pisanti F, Riccardi G, Rivellese AA. Post-prandial triglyceride profile in a population-based sample of Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2004;47:19-22 Epub 2003 Nov 26.
5. Schmidt-Nielsen K, Haines HB, Hackel DB. Diabetes Mellitus In The Sand Rat Induced By Standard Laboratory Diets. *Science* 1964;143:689-90.
6. Shafir E, Gutman A. Psammomys obesus of the Jerusalem colony: a model for nutritionally induced, non-insulin-dependent diabetes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1993;4:83-99.
7. Stryer L, J.M. Berg, and J.L. Tymoczko. *Biochimie*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences. 2003.
8. Kruit JK, Groen AK, van Berkel TJ, Kuipers F. Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J Gastroenterol* 2006;12:6429-39.
9. Levy E, Spahis S, Sinnett D, Peretti N, Maupas-Schwalm F, Delvin E, Lambert M, Lavoie MA. Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:310-8.
10. Wilson MD, Rudel LL. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J Lipid Res* 1994;35:943-55.
11. Chappell DA, Medh JD. Receptor-mediated mechanisms of lipoprotein remnant catabolism. *Prog Lipid Res* 1998;37:393-422.
12. Oram JF, Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res* 1996;37:2473-91.
13. Russell DW. Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc Drugs Ther* 1992;6:103-10.

14. Tomkin GH. Targets for intervention in dyslipidemia in diabetes. *Diabetes Care* 2008;31:S241-8.
15. Kramer W, Girbig F, Corsiero D, Burger K, Fahrenholz F, Jung C, Muller G. Intestinal cholesterol absorption: identification of different binding proteins for cholesterol and cholesterol absorption inhibitors in the enterocyte brush border membrane. *Biochim Biophys Acta* 2003;1633:13-26.
16. Compassi S, Werder M, Boffelli D, Weber FE, Hauser H, Schulthess G. Cholesteryl ester absorption by small intestinal brush border membrane is protein-mediated. *Biochemistry* 1995;34:16473-82.
17. Haikal Z, Play B, Landrier JF, Giraud A, Ghiringhelli O, Lairon D, Jourdeuil-Rahmani D. NPC1L1 and SR-BI are Involved in Intestinal Cholesterol Absorption from Small-Size Lipid Donors. *Lipids* 2008;43:401-408 Epub 2008 Mar 29.
18. Febbraio M, Guy E, Coburn C, Knapp FF, Jr., Beets AL, Abumrad NA, Silverstein RL. The impact of overexpression and deficiency of fatty acid translocase (FAT)/CD36. *Mol Cell Biochem* 2002;239:193-7.
19. Greaves DR, Gough PJ, Gordon S. Recent progress in defining the role of scavenger receptors in lipid transport, atherosclerosis and host defence. *Curr Opin Lipidol* 1998;9:425-32.
20. Connelly MA, Williams DL. Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:287-95.
21. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996;271:515.
22. Trigatti B, Rigotti A. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) and high-density lipoprotein metabolism: recent lessons from genetically manipulated mice. *Int J Tissue React* 2000;22:29-37.
23. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem* 1994;269:21003.
24. Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 1995;270:16221-4.
25. Murao K, Terpstra V, Green SR, Kondratenko N, Steinberg D, Quehenberger O. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem* 1997;272:17551-7.

26. Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 1997;387:414-7.
27. Ueda Y, Royer L, Gong E, Zhang J, Cooper PN, Francone O, Rubin EM. Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *J Biol Chem* 1999;274:7165-71.
28. Rhainds D, Brodeur M, Lapointe J, Charpentier D, Falstraalt L, Brissette L. The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. *Biochemistry* 2003;42:7527-38.
29. Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12610-5.
30. Varban ML, Rinninger F, Wang N, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Gosselin ML, Dixon KL, Deeds JD, Acton SL, Tall AR, Huszar D. Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4619-24.
31. Hauser H, Dyer JH, Nandy A, Vega MA, Werder M, Bieliauskaite E, Weber FE, Compassi S, Gemperli A, Boffelli D, Wehrli E, Schulthess G, Phillips MC. Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. *Biochemistry* 1998;37:17843-50.
32. Cai SF, Kirby RJ, Howles PN, Hui DY. Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *J Lipid Res* 2001;42:902-9.
33. Mardones P, Quinones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, Miettinen HE, Trigatti B, Krieger M, VanPatten S, Cohen DE, Rigotti A. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res* 2001;42:170-80.
34. Bietrix F, Yan D, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Comera C, Schaak S, Barbaras R, Groen AK, Perret B, Terce F, Collet X. Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem* 2006;281:7214-9 Epub 2006 Jan 18.
35. Levy E, Menard D, Suc I, Delvin E, Marcil V, Brissette L, Thibault L, Bendayan M. Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J Cell Sci* 2004;117:327-37.

36. Labonte ED, Howles PN, Granholm NA, Rojas JC, Davies JP, Ioannou YA, Hui DY. Class B type I scavenger receptor is responsible for the high affinity cholesterol binding activity of intestinal brush border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:1132-9 Epub 2007 Mar 16.
37. Smart EJ, De Rose RA, Farber SA. Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3450-5 Epub 2004 Feb 25.
38. Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, Lee D, Jandacek RJ, Abumrad NA, Tso P. CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* 2006;131:1197-207 Epub 2006 Aug 16.
39. Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF, Silverstein RL. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 1999;274:19055-62.
40. Ibrahimi A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, Zhong K, Cameron R, Abumrad NA. Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J Biol Chem* 1999;274:26761-6.
41. Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R, He J, Lee JH, Khadem S, Ren S, Li S, Silverstein RL, Xie W. Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology* 2008;134:556-67 Epub 2007 Nov 28.
42. Drover VA, Ajmal M, Nassir F, Davidson NO, Nauli AM, Sahoo D, Tso P, Abumrad NA. CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest* 2005;115:1290-7 Epub 2005 Apr 7.
43. Goudriaan JR, Dahlmans VE, Febbraio M, Teusink B, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. Intestinal lipid absorption is not affected in CD36 deficient mice. *Mol Cell Biochem* 2002;239:199-202.
44. Connelly MA, Klein SM, Azhar S, Abumrad NA, Williams DL. Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J Biol Chem* 1999;274:41-7.
45. de Villiers WJ, Cai L, Webb NR, de Beer MC, van der Westhuyzen DR, de Beer FC. CD36 does not play a direct role in HDL or LDL metabolism. *J Lipid Res* 2001;42:1231-8.

46. Werder M, Han CH, Wehrli E, Bimmler D, Schulthess G, Hauser H. Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine. *Biochemistry* 2001;40:11643-50.
47. Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW, Abumrad NA. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem* 2007;282:19493-501 Epub 2007 May 15.
48. Salisbury BG, Davis HR, Burrier RE, Burnett DA, Bowkow G, Caplen MA, Clemmons AL, Compton DS, Hoos LM, McGregor DG, et al. Hypocholesterolemic activity of a novel inhibitor of cholesterol absorption, SCH 48461. *Atherosclerosis* 1995;115:45-63.
49. Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004;303:1201-4.
50. Davies JP, Levy B, Ioannou YA. Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1. 2000.
51. Sane AT, Sinnott D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Menard D, Beaulieu JF, Levy E. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* 2006;47:2112-20 Epub 2006 Jul 7.
52. Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, Crona JH, Davis HR, Jr., Dean DC, Detmers PA, Graziano MP, Hughes M, Macintyre DE, Ogawa A, O'Neill K A, Iyer SP, Shevell DE, Smith MM, Tang YS, Makarewicz AM, Ujjainwalla F, Altmann SW, Chapman KT, Thornberry NA. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8132-7 Epub 2005 May 31.
53. Yamanashi Y, Takada T, Suzuki H. Niemann-Pick C1-like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and beta-sitosterol uptake in CaCo-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320:559-64 Epub 2006 Nov 29.
54. Knopf M, Davies JP, Duong PT, Kvaerno L, Carreira EM, Phillips MC, Ioannou YA, Hauser H. Multiple plasma membrane receptors but not NPC1L1 mediate high-affinity, ezetimibe-sensitive cholesterol uptake into the intestinal brush border membrane. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:1140-7 Epub 2007 Jun 23.
55. Yu L, Bharadwaj S, Brown JM, Ma Y, Du W, Davis MA, Michaely P, Liu P, Willingham MC, Rudel LL. Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem* 2006;281:6616-24 Epub 2005 Dec 30.

56. Temel RE, Tang W, Ma Y, Rudel LL, Willingham MC, Ioannou YA, Davies JP, Nilsson LM, Yu L. Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *J Clin Invest* 2007;117:1968-78.
57. Davies JP, Scott C, Oishi K, Liapis A, Ioannou YA. Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 2005;280:12710-20 Epub 2005 Jan 25.
58. Gratton JP, Bernatchez P, Sessa WC. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ Res* 2004;94:1408-17.
59. Harder T, Kellner R, Parton RG, Gruenberg J. Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 1997;8:533-45.
60. Kramer W, Corsiero D, Girbig F, Jahne G. Rabbit small intestine does not contain an annexin II/caveolin 1 complex as a target for 2-azetidinone cholesterol absorption inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:45-54 Epub 2006 Jan 18.
61. Garver WS, Hossain GS, Winscott MM, Heidenreich RA. The *Npc1* mutation causes an altered expression of caveolin-1, annexin II and protein kinases and phosphorylation of caveolin-1 and annexin II in murine livers. *Biochim Biophys Acta* 1999;1453:193-206.
62. Mayran N, Parton RG, Gruenberg J. Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *Embo J* 2003;22:3242-53.
63. Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 1976;191:150-4.
64. Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med* 1999;77:306-15.
65. Zhang DW, Garuti R, Tang WJ, Cohen JC, Hobbs HH. Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13045-50 Epub 2008 Aug 27.
66. Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res* 1993;34:1637-59.
67. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001;42:1007-17.

68. Oram JF, Vaughan AM. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res* 2006;99:1031-43.
69. Mulligan JD, Flowers MT, Tebon A, Bitgood JJ, Wellington C, Hayden MR, Attie AD. ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens. *J Biol Chem* 2003;278:13356-66 Epub 2003 Jan 27.
70. Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev* 2005;85:1343-72.
71. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006;116:1052-62 Epub 2006 Mar 16.
72. Basso F, Freeman L, Knapper CL, Remaley A, Stonik J, Neufeld EB, Tansey T, Amar MJ, Fruchart-Najib J, Duverger N, Santamarina-Fojo S, Brewer HB, Jr. Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res* 2003;44:296-302 Epub 2002 Nov 4.
73. Sahoo D, Trischuk TC, Chan T, Drover VA, Ho S, Chimini G, Agellon LB, Agnihotri R, Francis GA, Lehner R. ABCA1-dependent lipid efflux to apolipoprotein A-I mediates HDL particle formation and decreases VLDL secretion from murine hepatocytes. *J Lipid Res* 2004;45:1122-31 Epub 2004 Mar 1.
74. Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJ, Hayden MR. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1322-32 Epub 2003 May 22.
75. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000;290:1771-5.
76. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 2002;110:671-80.
77. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16237-42 Epub 2002 Nov 20.

78. Tachibana S, Hirano M, Hirata T, Matsuo M, Ikeda I, Ueda K, Sato R. Cholesterol and plant sterol efflux from cultured intestinal epithelial cells is mediated by ATP-binding cassette transporters. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71:1886-95 Epub 2007 Aug 7.
79. Wu JE, Basso F, Shamburek RD, Amar MJ, Vaisman B, Szakacs G, Joyce C, Tansey T, Freeman L, Paigen BJ, Thomas F, Brewer HB, Jr., Santamarina-Fojo S. Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2004;279:22913-25 Epub 2004 Mar 25.
80. Kusters A, Frijters RJ, Schaap FG, Vink E, Plosch T, Ottenhoff R, Jirsa M, De Cuyper IM, Kuipers F, Groen AK. Relation between hepatic expression of ATP-binding cassette transporters G5 and G8 and biliary cholesterol secretion in mice. *J Hepatol* 2003;38:710-6.
81. Yu L, Gupta S, Xu F, Liverman AD, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Repa JJ, Hobbs HH, Cohen JC. Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion. *J Biol Chem* 2005;280:8742-7 Epub 2004 Dec 16.
82. Salen G, Horak I, Rothkopf M, Cohen JL, Speck J, Tint GS, Shore V, Dayal B, Chen T, Shefer S. Lethal atherosclerosis associated with abnormal plasma and tissue sterol composition in sitosterolemia with xanthomatosis. *J Lipid Res* 1985;26:1126-33.
83. Liscum L, Cummings RD, Anderson RG, DeMartino GN, Goldstein JL, Brown MS. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase: a transmembrane glycoprotein of the endoplasmic reticulum with N-linked "high-mannose" oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:7165-9.
84. Friesen JA, Rodwell VW. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol* 2004;5:248 Epub 2004 Nov 1.
85. Sever N, Song BL, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, DeBose-Boyd RA. Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem* 2003;278:52479-90 Epub 2003 Oct 16.
86. Song BL, Sever N, DeBose-Boyd RA. Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Mol Cell* 2005;19:829-40.
87. Chang TY, Chang CC, Cheng D. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu Rev Biochem* 1997;66:613-38.

88. Miyazaki A, Sakashita N, Lee O, Takahashi K, Horiuchi S, Hakamata H, Morganelli PM, Chang CC, Chang TY. Expression of ACAT-1 protein in human atherosclerotic lesions and cultured human monocytes-macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1568-74.
89. Cases S, Novak S, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Welch CB, Lusis AJ, Spencer TA, Krause BR, Erickson SK, Farese RV, Jr. ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization. 1998.
90. Chang CC, Sakashita N, Ornvold K, Lee O, Chang ET, Dong R, Lin S, Lee CY, Strom SC, Kashyap R, Fung JJ, Farese RV, Jr., Patoiseau JF, Delhon A, Chang TY. Immunological quantitation and localization of ACAT-1 and ACAT-2 in human liver and small intestine. *J Biol Chem* 2000;275:28083-92.
91. Hori M, Satoh M, Furukawa K, Sakamoto Y, Hakamata H, Komohara Y, Takeya M, Sasaki Y, Miyazaki A, Horiuchi S. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-2 (ACAT-2) is responsible for elevated intestinal ACAT activity in diabetic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1689-95 Epub 2004 Jul 8.
92. Buhman KK, Accad M, Novak S, Choi RS, Wong JS, Hamilton RL, Turley S, Farese RV, Jr. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med* 2000;6:1341-7.
93. Repa JJ, Buhman KK, Farese RV, Jr., Dietschy JM, Turley SD. ACAT2 deficiency limits cholesterol absorption in the cholesterol-fed mouse: impact on hepatic cholesterol homeostasis. *Hepatology* 2004;40:1088-97.
94. Temel RE, Hou L, Rudel LL, Shelness GS. ACAT2 stimulates cholesteryl ester secretion in apoB-containing lipoproteins. *J Lipid Res* 2007;48:1618-27 Epub 2007 Apr 16.
95. Matsuda H, Hakamata H, Miyazaki A, Sakai M, Chang CC, Chang TY, Kobori S, Shichiri M, Horiuchi S. Activation of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase activity by cholesterol is not due to altered mRNA levels in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1996;1301:76-84.
96. Pramfalk C, Angelin B, Eriksson M, Parini P. Cholesterol regulates ACAT2 gene expression and enzyme activity in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;364:402-9 Epub 2007 Oct 15.
97. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109:1125-31.

98. Knight BL, Patel DD, Humphreys SM, Wiggins D, Gibbons GF. Inhibition of cholesterol absorption associated with a PPAR alpha-dependent increase in ABC binding cassette transporter A1 in mice. *J Lipid Res* 2003;44:2049-58 Epub 2003 Aug 1.
99. Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem* 2001;276:37735-8 Epub 2001 Jul 17.
100. Wong J, Quinn CM, Brown AJ. SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochem J* 2006;400:485-91.
101. Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:215-22 Epub 2007 Feb 15.
102. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol* 2004;10:3081-7.
103. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004;86:839-48.
104. Alrefai WA, Annaba F, Sarwar Z, Dwivedi A, Saksena S, Singla A, Dudeja PK, Gill RK. Modulation of human Niemann-Pick C1-like 1 gene expression by sterol: Role of sterol regulatory element binding protein 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G369-76 Epub 2006 Sep 28.
105. Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest* 1998;101:2331-9.
106. Horton JD, Shimomura I. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:143-50.
107. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 2001;294:1866-70.
108. Tamura K, Chen YE, Horiuchi M, Chen Q, Daviet L, Yang Z, Lopez-Illasaca M, Mu H, Pratt RE, Dzau VJ. LXRalpha functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8513-8518.
109. Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G, Pfahl M. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *J Biol Chem* 1994.

110. Lund EG, Peterson LB, Adams AD, Lam MH, Burton CA, Chin J, Guo Q, Huang S, Latham M, Lopez JC, Menke JG, Milot DP, Mitnaul LJ, Rex-Rabe SE, Rosa RL, Tian JY, Wright SD, Sparrow CP. Different roles of liver X receptor alpha and beta in lipid metabolism: effects of an alpha-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. *Biochem Pharmacol* 2006;71:453-63 Epub 2005 Dec 2.
111. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 1995;9:1033-1045.
112. Ohama T, Hirano K, Zhang Z, Aoki R, Tsujii K, Nakagawa-Toyama Y, Tsukamoto K, Ikegami C, Matsuyama A, Ishigami M, Sakai N, Hiraoka H, Ueda K, Yamashita S, Matsuzawa Y. Dominant expression of ATP-binding cassette transporter-1 on basolateral surface of Caco-2 cells stimulated by LXR/RXR ligands. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:625-30.
113. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002;277:18793-800 Epub 2002 Mar 18.
114. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000;289:1524-9.
115. Duval C, Touche V, Tailleux A, Fruchart JC, Fievet C, Clavey V, Staels B, Lestavel S. Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:1259-63 Epub 2006 Jan 5.
116. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998;93:693-704.
117. Alberti S, Schuster G, Parini P, Feltkamp D, Diczfalusy U, Rudling M, Angelin B, Bjorkhem I, Pettersson S, Gustafsson JA. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J Clin Invest* 2001;107:565-73.
118. Ishimoto K, Tachibana K, Sumitomo M, Omote S, Hanano I, Yamasaki D, Watanabe Y, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T. Identification of human low-density lipoprotein receptor as a novel target gene regulated by liver X receptor alpha. *FEBS Lett* 2006;580:4929-33 Epub 2006 Aug 14.
119. Quinet EM, Savio DA, Halpern AR, Chen L, Schuster GU, Gustafsson JA, Basso MD, Nambi P. Liver X receptor (LXR)-beta regulation in LXRalpha-

- deficient mice: implications for therapeutic targeting. *Mol Pharmacol* 2006;70:1340-9 Epub 2006 Jul 6.
120. Vidal H. [PPAR receptors: recent data]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2005;66:1S5-9.
 121. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000;405:421-4.
 122. Clarke SD, Thuillier P, Baillie RA, Sha X. Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors. *Am J Clin Nutr* 1999;70:566-71.
 123. Ferre P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 2004;53:S43-50.
 124. Valasek MA, Clarke SL, Repa JJ. Fenofibrate reduces intestinal cholesterol absorption via PPARalpha-dependent modulation of NPC1L1 expression in mouse. *J Lipid Res* 2007;48:2725-35 Epub 2007 Aug 28.
 125. Fruchart JC. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation and high-density lipoprotein metabolism. *Am J Cardiol* 2001;88:24N-29N.
 126. Berthou L, Duverger N, Emmanuel F, Langouet S, Auwerx J, Guillouzo A, Fruchart JC, Rubin E, Deneffe P, Staels B, Branellec D. Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J Clin Invest* 1996;97:2408-16.
 127. Lopez D, McLean MP. Activation of the rat scavenger receptor class B type I gene by PPARalpha. *Mol Cell Endocrinol* 2006;251:67-77 Epub 2006 Apr 3.
 128. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J* 1996;15:5336-48.
 129. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, Auwerx J. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* 1995;96:741-50.
 130. Konig B, Koch A, Spielmann J, Hilgenfeld C, Stangl GI, Eder K. Activation of PPARalpha lowers synthesis and concentration of cholesterol by reduction of nuclear SREBP-2. *Biochem Pharmacol* 2007;73:574-85 Epub 2006 Nov 10.
 131. Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1996;137:354-66.

132. van der Veen JN, Kruit JK, Havinga R, Baller JF, Chimini G, Lestavel S, Staels B, Groot PH, Groen AK, Kuipers F. Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1. *J Lipid Res* 2005;46:526-34 Epub 2004 Dec 16.
133. Oliver WR, Jr., Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Klier SA, Hansen BC, Willson TM. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5306-11 Epub 2001 Apr 17.
134. Lemberger T, Braissant O, Juge-Aubry C, Keller H, Saladin R, Staels B, Auwerx J, Burger AG, Meier CA, Wahli W. PPAR tissue distribution and interactions with other hormone-signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 1996;804:231-51.
135. Kersten S. Peroxisome proliferator activated receptors and lipoprotein metabolism. *PPAR Res* 2008;2008:132960.
136. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefebvre PJ, Murray GD, Standl E, Wilcox RG, Wilhelmsen L, Betteridge J, Birkeland K, Golay A, Heine RJ, Koranyi L, Laakso M, Mokan M, Norkus A, Pirags V, Podar T, Scheen A, Scherbaum W, Schernthaner G, Schmitz O, Skrha J, Smith U, Taton J. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366:1279-1289.
137. Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP, Kravitz BG, Lachin JM, O'Neill MC, Zinman B, Viberti G. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med* 2006;355:2427-2443.
138. Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, Buse JB, Zagar AJ, Pinaire JA, Tan MH, Khan MA, Perez AT, Jacober SJ. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2005;28:1547-54.
139. Klopotek A, Hirche F, Eder K. PPAR gamma ligand troglitazone lowers cholesterol synthesis in HepG2 and Caco-2 cells via a reduced concentration of nuclear SREBP-2. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:1365-72.
140. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:171-6.

141. Cancello R, Tounian A, Poitou C, Clement K. Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabetes Metab* 2004;30:215-27.
142. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E827-47.
143. Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 2001;50:S154-9.
144. Boden G. Pathogenesis of type 2 diabetes. Insulin resistance. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:801-15, v.
145. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005;365:1333-46.
146. Barnett AH. The importance of treating cardiometabolic risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res* 2008;5:9-14.
147. Windler E. What is the consequence of an abnormal lipid profile in patients with type 2 diabetes or the metabolic syndrome? *Atheroscler Suppl* 2005;6:11-4.
148. Bloks VW, Bakker-Van Waarde WM, Verkade HJ, Kema IP, Wolters H, Vink E, Groen AK, Kuipers F. Down-regulation of hepatic and intestinal Abcg5 and Abcg8 expression associated with altered sterol fluxes in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2004;47:104-12 Epub 2003 Nov 14.
149. Roberts CK, Liang K, Barnard RJ, Kim CH, Vaziri ND. HMG-CoA reductase, cholesterol 7 α -hydroxylase, LDL receptor, SR-B1, and ACAT in diet-induced syndrome X. *Kidney Int* 2004;66:1503-11.
150. Bonen A, Parolin ML, Steinberg GR, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *Faseb J* 2004;18:1144-6 Epub 2004 May 7.
151. Sampson MJ, Davies IR, Braschi S, Ivory K, Hughes DA. Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2003;167:129-34.
152. Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CL, Ong H, Vance DE, Dyck JR. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia

- associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 2007;56:2863-71 Epub 2007 Aug 29.
153. Lally S, Owens D, Tomkin GH. Genes that affect cholesterol synthesis, cholesterol absorption, and chylomicron assembly: the relationship between the liver and intestine in control and streptozotocin diabetic rats. *Metabolism* 2007;56:430-8.
 154. Gleeson A, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. The relationship between cholesterol absorption and intestinal cholesterol synthesis in the diabetic rat model. *Int J Exp Diabetes Res* 2000;1:203-10.
 155. Gylling H, Miettinen TA. Cholesterol absorption, synthesis, and LDL metabolism in NIDDM. *Diabetes Care* 1997;20:90-5.
 156. Lally S, Owens D, Tomkin GH. The different effect of pioglitazone as compared to insulin on expression of hepatic and intestinal genes regulating post-prandial lipoproteins in diabetes. *Atherosclerosis* 2007;193:343-51 Epub 2006 Nov 15.
 157. Niesen M, Bedi M, Lopez D. Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 2008;470:111-5 Epub 2007 Nov 22.
 158. Austin MA, Edwards KL. Small, dense low density lipoproteins, the insulin resistance syndrome and noninsulin-dependent diabetes. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:167-71.
 159. Feingold KR, Wilson DE, Wood LC, Kwong LK, Moser AH, Grunfeld C. Diabetes increases hepatic hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase protein and mRNA levels in the small intestine. *Metabolism* 1994;43:450-4.
 160. Uehara Y, Engel T, Li Z, Goepfert C, Rust S, Zhou X, Langer C, Schachtrup C, Wiekowski J, Lorkowski S, Assmann G, von Eckardstein A. Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1. *Diabetes* 2002;51:2922-8.
 161. Forcheron F, Cachefo A, Thevenon S, Pinteur C, Beylot M. Mechanisms of the triglyceride- and cholesterol-lowering effect of fenofibrate in hyperlipidemic type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2002;51:3486-91.
 162. van Waarde WM, Verkade HJ, Wolters H, Havinga R, Baller J, Bloks V, Muller M, Sauer PJ, Kuipers F. Differential effects of streptozotocin-induced diabetes on expression of hepatic ABC-transporters in rats. *Gastroenterology* 2002;122:1842-52.

163. Simonen PP, Gylling HK, Miettinen TA. Diabetes contributes to cholesterol metabolism regardless of obesity. *Diabetes Care* 2002;25:1511-5.
164. O'Meara NM, Devery RA, Owens D, Collins PB, Johnson AH, Tomkin GH. Serum lipoproteins and cholesterol metabolism in two hypercholesterolaemic rabbit models. *Diabetologia* 1991;34:139-43.
165. Zoltowska M, Ziv E, Delvin E, Stan S, Bar-On H, Kalman R, Levy E. Circulating lipoproteins and hepatic sterol metabolism in *Psammomys obesus* prone to obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Atherosclerosis* 2001;157:85-96.
166. Young NL, Saudek CD, Crawford SA. Total hydroxymethylglutaryl CoA reductase activity in the small intestine and liver of insulin-deficient rats. *J Lipid Res* 1982;23:266-75.
167. Jiao S, Matsuzawa Y, Matsubara K, Kihara S, Nakamura T, Tokunaga K, Kubo M, Tarui S. Increased activity of intestinal acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in rats with streptozocin-induced diabetes and restoration by insulin supplementation. *Diabetes* 1988;37:342-6.
168. Maechler P, Wollheim CB, Bentzen CL, Niesor E. Role of the intestinal acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity in the hyperresponse of diabetic rats to dietary cholesterol. *J Lipid Res* 1992;33:1475-84.
169. Becard D, Hainault I, Azzout-Marniche D, Bertry-Coussot L, Ferre P, Foufelle F. Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice. *Diabetes* 2001;50:2425-30.
170. Ishikawa M, Iwasaki Y, Yatoh S, Kato T, Kumadaki S, Inoue N, Yamamoto T, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Yahagi N, Kobayashi K, Takahashi A, Yamada N, Shimano H. Overexpression of nuclear SREBP-2 in pancreatic beta -cells results in cholesterol accumulation leading to insulin secretion defects and diabetes:A new model for beta -cell lipotoxicity.
171. Edwards PA, Kast HR, Anisfeld AM. BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J Lipid Res* 2002;43:2-12.
172. Laffitte BA, Chao LC, Li J, Walczak R, Hummasti S, Joseph SB, Castrillo A, Wilpitz DC, Mangelsdorf DJ, Collins JL, Saez E, Tontonoz P. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5419-24 Epub 2003 Apr 15.
173. Guan JZ, Tamasawa N, Murakami H, Matsui J, Tanabe J, Matsuki K, Yamashita M, Suda T. HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin improves

- reverse cholesterol transport in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb* 2008;15:20-5 Epub 2008 Feb 9.
174. Powell EE, Kroon PA. Low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in human mononuclear leukocytes is regulated coordinately and parallels gene expression in human liver. *J Clin Invest* 1994;93:2168-74.
 175. Asayama K, Sandhir R, Sheikh FG, Hayashibe H, Nakane T, Singh I. Increased peroxisomal fatty acid beta-oxidation and enhanced expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in diabetic rat liver. *Mol Cell Biochem* 1999;194:227-34.
 176. Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR. Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology* 2000;141:4021-31.
 177. Kalman R, Ziv E, Shafrir E, Bar-On H, Perez R. Psammomys obesus and the albino rat--two different models of nutritional insulin resistance, representing two different types of human populations. *Lab Anim* 2001;35:346-52.
 178. Davis HR, Jr., Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 2004;279:33586-92 Epub 2004 Jun 1.
 179. Field FJ, Watt K, Mathur SN. Ezetimibe interferes with cholesterol trafficking from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 2007;48:1735-45 Epub 2007 May 1.
 180. Briones ER, Steiger DL, Palumbo PJ, O'Fallon WM, Langworthy AL, Zimmerman BR, Kottke BA. Sterol excretion and cholesterol absorption in diabetics and nondiabetics with and without hyperlipidemia. *Am J Clin Nutr* 1986;44:353-61.
 181. Sutherland WH, Scott RS, Lintott CJ, Robertson MC, Stapely SA, Cox C. Plasma non-cholesterol sterols in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 1992;24:172-5.
 182. Lally SE, Owens D, Tomkin GH. Sitosterol and cholesterol in chylomicrons of type 2 diabetic and non-diabetic subjects: the relationship with ATP binding cassette proteins G5 and G8 and Niemann-Pick C1-like 1 mRNA. *Diabetologia* 2007;50:217-9 Epub 2006 Nov 11.

183. Attie AD. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. Trends Biochem Sci 2007;32:172-9 Epub 2007 Feb 26.
184. Krieger M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. J Clin Invest 2001;108:793-7.